

**Auswirkung der Bindung verschiedener
magnetischer Nanopartikel an Zellen auf die
Wärmegenerierung in einem magnetischen
Wechselfeld: eine In-vitro-Studie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susanne Katharina Polloczek
geboren am 29. Mai 1979 in Ansbach

Gutachter

1.
2.
3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
c	spezifische Wärmekapazität [$\text{kJ} \times \text{kg}^{-1} \times \text{K}^{-1}$]
CLIO	Cross linked iron oxide
CMD	Carboxymethyldextran
Cu	Kupfer
DAPI	4, 6 - Diamidinophenylindol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et aliae
f	Frequenz [Hz]
Fe_3O_4	Magnetit
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung [$9,80665 \text{ m/s}^2$]
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemit
H	magnetische Feldstärke [$\text{A} \times \text{m}^{-1}$]
IgG	Immunglobuline der Klasse G
K	Kelvin
kA	Kiloampere
LD_{50}	Dosis letalis
LDL	Low density lipoproteins
M	molar

mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
MION	Monocrystalline iron oxide nanocompound
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPS	Mononukleäres phagozytierendes System
MRT	Magnetresonanztomographie
MWF	Magnetwechselfeld
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ρ	Dichte [g x cm ³]
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
SAR	spezifische Absorptionsrate [W/g]
SVEC4-10	Simian virus endothel cells
SPIO	Superparamagnetic iron oxide
SXM	Scanning X Microscope
T2	Spin- Spin- Relaxationszeit, transversale Relaxationszeit
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
3	Material und Methoden	14
3.1	Arbeitsutensilien	14
3.1.1	Chemikalien	14
3.1.2	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien.....	15
3.2	Zellkulturexperimente	17
3.2.1	Beschreibung der verwendeten Zelllinie.....	17
3.2.2	Standardkulturbedingungen.....	18
3.2.3	Subkultivierung der Zellen	18
3.2.4	Auftauen und Einfrieren der Zellen	19
3.2.5	Test auf Kontamination der SVEC4-10-Zellen mit Mycoplasmen.....	20
3.3	Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Ferrofluide.....	21
3.4	Bestimmung der spezifischen Absorptionsrate	22
3.4.1	Bestimmung des Masseanteils an Eisenoxid in den Ferrofluiden und in den mit Ferrofluiden markierten Messansätzen	22
3.4.2	Temperaturmessung im magnetischen Wechselfeld	24
3.5	Markierung der SVEC4-10-Zellen mit magnetischen Nanopartikeln....	27
3.5.1	Chemische Kopplung der Ferrofluide an SVEC4-10-Zellen mit der Natrium-Perjodat-Methode	27
3.5.2	Einfluss der bei der chemischen Kopplung stattfindenden Hüllenaktivierung der Ferrofluide auf die SAR-Berechnung.....	28
3.6	Einbettung der mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen in ein visköses Medium.....	29
3.7	Temperaturerhöhung nach Bindung der Ferrofluide an die SVEC4-10-Zellen bei Exposition im magnetischen Wechselfeld	30
3.8	Berliner-Blau-Färbung nach Perls zum Eisennachweis in den SVEC4-10-Zellen.....	31

4	Ergebnisse	33
4.1	Untersuchung der SVEC4-10-Zellen auf Mycoplasmen	33
4.2	Untersuchung von Ferrofluid A	34
4.2.1	<i>Temperaturänderung von SVEC4-10-Zellen nach Markierung mit Ferrofluid A bei Exposition im magnetischen Wechselfeld</i>	<i>34</i>
4.2.2	<i>Analyse des Eisengehalts.....</i>	<i>35</i>
4.2.3	<i>SAR-Berechnung des nativen Ferrofluids A und nach Bindung von Ferrofluid A an die SVEC4-10-Zellen</i>	<i>36</i>
4.3	Untersuchung von Ferrofluid B	39
4.3.1	<i>Temperaturänderung von SVEC4-10-Zellen nach Markierung mit Ferrofluid B bei Exposition im magnetischen Wechselfeld</i>	<i>39</i>
4.3.2	<i>Analyse des Eisengehalts.....</i>	<i>40</i>
4.3.3	<i>SAR-Berechnung des nativen Ferrofluids B und nach Bindung von Ferrofluid B an die SVEC4-10-Zellen</i>	<i>41</i>
4.4	Untersuchung von Ferrofluid C	43
4.4.1	<i>Temperaturänderung von SVEC4-10-Zellen nach Markierung mit Ferrofluid C bei Exposition im magnetischen Wechselfeld.....</i>	<i>43</i>
4.4.2	<i>Analyse des Eisengehalts.....</i>	<i>44</i>
4.4.3	<i>Auswirkung der Hüllenaktivierung der magnetischen Nanopartikel in Ferrofluid C auf die SAR-Messung</i>	<i>45</i>
4.4.4	<i>SAR-Berechnung von Ferrofluid C nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen und von Ferrofluid C nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen und zusätzlicher Einbettung.....</i>	<i>46</i>
4.5	Nachweis der unspezifischen Bindung der magnetischen Nanopartikel an die SVEC4-10-Zellen mit der Berliner-Blau-Färbung .	49
5	Diskussion	50
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang.....	73
7.1	Danksagung.....	73
7.2	Lebenslauf	74
7.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	75

1 Zusammenfassung

Magnetische Nanopartikel werden bereits seit einigen Jahren als Kontrastmittel in der MRT-Bildgebung eingesetzt und dienen hierbei der frühzeitigen Darstellung pathologischer Prozesse. Aber nicht nur diese ist mit Hilfe der magnetischen Nanopartikel möglich. Ein weiteres potenzielles Anwendungsgebiet der magnetischen Nanopartikel ist ihr Einsatz in der Therapie maligner Prozesse.

Es existieren verschiedene Behandlungsansätze zur Zerstörung von Tumoren durch den Einsatz von Wärme. Bei der so genannten magnetischen Thermoablation werden zytotoxische Temperaturen von über 50°C unter Zuhilfenahme von Eisenoxidpartikeln, speziell Partikeln aus Magnetit, erzeugt. Ziel der magnetischen Thermoablation ist es, die Eisenoxidpartikel im Tumorareal anzureichern und mittels eines externen magnetischen Wechselfeldes die einzelnen Partikel anzuregen. Hierbei absorbieren die Partikel Energie, welche nachfolgend in Wärme umgewandelt wird. Die starke Wärmeentwicklung führt dazu, dass die Tumorzellen geschädigt werden. Eine neue Darreichungsform von Eisenoxidpartikeln sind die so genannten Ferrofluide, die aus kolloidal suspendierten sehr kleinen Eisenoxidpartikeln bestehen, welche von einer Hülle umgeben sind. Da die in einem Ferrofluid enthaltenen Eisenoxidpartikel nur einige Nanometer groß sind, spricht man auch von magnetischen Nanopartikeln.

In bisherigen Untersuchungen zur magnetischen Wärmebehandlung von Tumoren wurden die magnetischen Nanopartikel meist intratumoral injiziert. Eine intratumorale Applikation von magnetischen Nanopartikeln ist aber nur bei unifokalen, oberflächlich liegenden Tumoren möglich; multifokale Tumore können mit dieser Applikationsart schlecht erreicht werden. Auf lange Sicht ist es vorstellbar, Nanopartikel antikörpervermittelt an Tumorzellen zu binden. Vor dieser gezielten Applikation von magnetischen Nanopartikeln im Sinne einer antikörpervermittelten Bindung sind zunächst einige Grundlagen zu klären. Hierfür wurde eine unspezifische Bindung der magnetischen Nanopartikel an Zellen modelliert und die Auswirkungen dieser Bindung auf die Wärmegenerierung im Magnetwechselfeld untersucht. Bislang existieren nur Daten über ein Ferrofluid welches unspezifisch an Zellen gebunden wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun verschiedene neue Ferrofluide und deren unspezifisches Bindungsvermögen an Zellen untersucht werden.

Hierbei war zunächst von Interesse, welche Temperaturanstiege durch unspezifisch an Zellen gebundene Ferrofluide bei Exposition im Magnetwechselfeld erzeugt werden können.

Ferner soll überprüft werden, ob mit den verschiedenen ähnlich aufgebauten Ferrofluiden bei Exposition im Magnetwechselfeld auch vergleichbare Temperaturanstiege erzeugt werden können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht darin, die verschiedenen Ferrofluide durch die Bestimmung ihrer spezifischen Absorptionsrate (SAR) zu charakterisieren.

Hierbei sollte zunächst die SAR der nativen Ferrofluide bestimmt werden. Es wird postuliert, dass nach der Bindung der magnetischen Nanopartikel an die Zellen die magnetischen Nanopartikel immobilisiert vorliegen, d.h. sie sind fixiert und können Energie nur noch durch Drehung des Magnetisierungsvektors innerhalb des Partikels erzeugen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde exemplarisch für ein Ferrofluid nach der Bindung an Zellen eine Einbettung in ein visköses Medium vorgenommen. Hierbei ergab sich keine signifikante Änderung der SAR im Vergleich zu den nur durch die Bindung an Zellen fixierten magnetischen Nanopartikeln. Um weitere Informationen zu den in einem Ferrofluid stattfindenden Rotationsprozessen zu erhalten, wurden im Verlauf dieser Arbeit noch SAR-Untersuchungen der Ferrofluide im immobilisierten Zustand nach Bindung an Zellen angestellt. Bisherige Untersuchungen zu unbeweglichen magnetischen Nanopartikeln basieren auf der Einbettung der Ferrofluide in einem Gel. Daten zur SAR nach Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Zellen sind bislang nicht bekannt.

Es stellte sich heraus, dass mit den einzelnen Ferrofluiden unterschiedliche Temperaturanstiege erzeugt werden konnten, wobei bei einem Ferrofluid A sehr hohe Werte von nahezu 10 Kelvin gemessen wurden.

Unter den SAR-Werten der Ferrofluide im nativen Zustand zeichnete sich das Ferrofluid B durch den höchsten Wert aus (125 ± 23 W/g). Nach Anlagerung an Zellen konnte bei allen Ferrofluiden ein Anstieg ihrer SAR beobachtet werden, allerdings gab es hier zwischen den Ferrofluiden große Unterschiede im Ausmaß des Anstiegs. Die Ursache für den Anstieg der SAR der Ferrofluide nach Bindung an Zellen ist noch unklar, wahrscheinlich sind dafür veränderte magnetische Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel nach der Bindung verantwortlich.

2 Einleitung

Die Nanotechnologie ist ein sehr junges Gebiet, in welchem es um die Erforschung, Anwendung und Herstellung von Strukturen im Nanometerbereich geht. Wesentliche Anwendungsfelder sind die Bereiche Nanoelektronik, Nanomechanik, Gassensorik, Flüssigkeitssensorik, chemische Katalyse, Oberflächenbeschichtungen, Nanopartikelsysteme sowie die Entwicklung von neuen Energiespeichermedien (Jordan 2001). Das Ausmaß der möglichen Anwendungen kann bislang nur erahnt werden, auch wenn in vielen technischen Bereichen bereits realisierte Produkte existieren. Beispiele hierfür sind hochdichte Datenspeicher und leistungsminimierte Prozessoren im Bereich der Elektronik oder neuartige funktionelle Schichten und Membranen zur Stofftrennung in der Materialwissenschaft, um nur einige zu nennen. Schon der spätere Nobelpreisträger R. P. Feynman sagte im Jahr 1959 voraus “there is plenty of room at the bottom” (Feynman 1959), womit er darauf anspielte, dass es noch ungeahnte Möglichkeiten bezüglich der Veränderung von Materie in allerkleinster Dimension gebe. Seine Überlegungen beinhalteten die Erzeugung von Linien mit atomarer Breite mittels Elektronenstrahlschreiber, die Herstellung neuer Computer mit Bauteilen im submikrometer Bereich und die Manipulation von Atomen zur gezielten Erzeugung erwünschter Materialeigenschaften. Ein entscheidender Schritt für die Nanotechnologie war die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops im Jahre 1981, welche die futuristisch wirkenden Visionen von Feynman zum Teil realisierbar machte. Ein Meilenstein in diese Richtung war auch die Erfindung des Atom-Kraft-Mikroskops sowie die darauf aufbauenden Raster-Sonden-Verfahren (SXM). Besonders die Fähigkeit der Oberflächenabbildung auf atomarem Niveau mittels SXM hat viele der heute bestehenden Innovationen erst ermöglicht.

Kleinste Materiebausteine aus nur wenigen hundert Atomen oder Molekülen werden als Nanopartikel bezeichnet (VDI 1998). Sie weisen aufgrund ihres kleinen Volumens und ihrer im Verhältnis dazu großen Oberfläche deutlich andere Eigenschaften in ihrem Verhalten als größere Festkörper auf. Beispielsweise rühren die schillernden Farben eines Schmetterlingsflügels von der wellenlängenselektiven Lichtabsorption unterschiedlich großer Partikel her. Auch die schmutzabweisende Oberfläche einer Lotusblüte ist in der Nanostrukturierung des Blattes begründet (Graydon 1998).

Seit nunmehr einem Jahrzehnt wird verstärkt Aufmerksamkeit auf so genannte magnetische Nanopartikel gerichtet. Unter magnetischen Nanopartikeln versteht man

magnetisierbare Teilchen, deren Größe weniger als 1 μm , meist sogar weniger als 500 nm beträgt (Berry et al. 2003). Magnetische Nanopartikel bewegen sich somit etwa in der Größenordnung eines Proteins (5-50 nm) oder eines Virus (20-450 nm) (Pankhurst et al. 2003).

Als magnetisierbare Mikropartikel kommen in erster Linie Oxide der 8. Nebengruppe bzw. deren Gemische in Frage (Günther 1996). Das Verhalten der magnetischen Nanopartikel wird zum einen von ihren magnetischen Eigenschaften bestimmt, zum anderen von der Größe der Partikel, deren Konzentration und der Art der Trägerflüssigkeit. Für biomedizinische Anwendungen sind die am meisten verbreiteten Nanopartikel Partikel aus Magnetit oder der oxidierten Form, dem Maghemit. Liegen magnetische Nanopartikel in wässriger Suspension vor, werden sie als magnetische Flüssigkeiten oder Ferrofluide bezeichnet. Sie vereinen normale rheologische Eigenschaften mit starken magnetischen Kraftwirkungen, die sich bereits in schwachen Magnetfeldern bemerkbar machen (Odenbach 2001). Stark magnetische Substanzen wie Nickel und Kobalt sind uninteressant für eine biomedizinische Anwendung, weil sie sehr toxisch und anfällig für Oxidationsprozesse sind (Merbach und Toth 2001, Wormuth 2001).

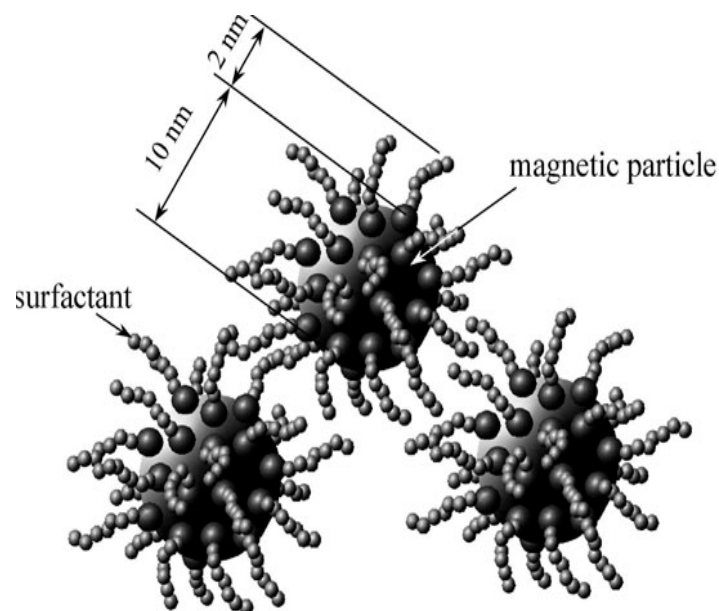


Abb. 1: Beispiel für magnetische Nanopartikel mit ihrer Hülle als Bestandteile eines Ferrofluids (Odenbach 2004).

Die Ferrofluide verhalten sich wie Flüssigkeiten und können, obwohl beispielsweise ferrimagnetisches Fe_3O_4 verwendet wird, superparamagnetisches Verhalten zeigen (Günther 1996).

Für ein besseres Verständnis sollen zunächst einige elementare Grundlagen des Magnetismus behandelt werden. Im atomaren Bereich gibt es drei grundsätzliche Mechanismen zur Erzeugung magnetischer Elementardipole: die Bahnbewegung des Elektrons, den Eigendrehimpuls des Elektrons und den Eigendrehimpuls des Protons. Die magnetischen Eigenschaften werden vom Spinmoment des Elektrons dominiert. Die Magnetisierbarkeit einer Substanz in einem Magnetfeld wird qualitativ als Dia-, Para-, Ferro-, Antiferro- und Ferrimagnetismus beschrieben (Schatt 1978). Diamagnetische Atome haben geschlossene oder vollständig aufgefüllte Valenzorbitale, die Spinmomente löschen sich gegenseitig aus.

Beim Paramagnetismus richten sich die Spinmomente der ungepaarten Elektronen parallel oder antiparallel zum magnetischen Feld aus. Ferro-, antiferro- und ferrimagnetische Werkstoffe zeigen eine spontane Magnetisierung auch ohne Einwirkung eines äußeren Felds. Die unterschiedliche Orientierung der Magnetisierungsvektoren macht hier eine Unterscheidung notwendig. Beim Ferromagnetismus sind die Vektoren parallel, beim Antiferro- und beim Ferrimagnetismus sind die Spins dagegen antiparallel angeordnet (Woltz 2003).

In ferrimagnetischen Materialien besteht eine starke Wechselwirkung zwischen den benachbarten Atomen. Die magnetischen Momente der Atome richten sich in ferrimagnetischen Stoffen über größere Kristallbereiche zueinander aus. Dadurch treten in einem ferrimagnetischen Material Bereiche mit einem resultierenden magnetischen Moment auf, die als Domänen oder Weiß'sche Bezirke bezeichnet werden (Woltz 2003). An den Rändern aneinander liegender Domänen ändert sich die Magnetisierungsrichtung nicht sprunghaft, sondern schrittweise innerhalb einer so genannten Domänen- oder Blochwand (Schatt 1978, Tipler 1995).

Das magnetische Verhalten von ferrimagnetischen Materialien ist abhängig von der Teilchengröße. Hierbei wird zwischen Mehrdomänenteilchen und Eindomänenteilchen unterschieden (Leslie-Pelecky 1996, Harris 2002). Bei größeren Teilchendurchmessern ist ein ferrimagnetischer Stoff in mehrere Bereiche aufgeteilt, die durch Domänenwände getrennt sind. Wird die Teilchengröße verkleinert, nimmt die Anzahl der Weiß'schen Bezirke pro Teilchen ab. Für jedes ferrimagnetische Material gibt es kritische Größen, unterhalb derer die Bildung von Weiß'schen Bezirken

energetisch ungünstig ist. Teilchen dieser Größenordnung bestehen nur noch aus einem magnetischen Bezirk und werden daher als Eindomänenpartikel bezeichnet. Diese Eindomänenpartikel können superparamagnetisches Verhalten zeigen. Der Begriff des Superparamagnetismus wurde erstmalig im Jahr 1952 beschrieben (Kobozev et al. 1952) und bezeichnet das Verhalten sehr kleiner Teilchen eines ferrimagnetischen Materials (z. B. das Verhalten von Eisenoxidpartikeln) in Pulvern oder Suspensionen, sich im Magnetfeld - ähnlich wie ein Ferromagnet - stark magnetisieren zu lassen, im Gegensatz zu diesem jedoch nach Abschalten des Magnetfelds keine Restmagnetisierung aufzuweisen (Bean und Jacobs 1956). Dieses Verhalten beruht darauf, dass superparamagnetische Substanzen, falls kein äußeres Feld angelegt ist, keine permanente Anordnung von magnetischen Dipolen besitzen. Superparamagnetismus tritt allerdings nur dann auf, wenn der Durchmesser kristalliner Bereiche in einem ferromagnetischen Material unterhalb eines kritischen Wertes liegt (Hülser 2003). Theoretisch entsteht der Superparamagnetismus durch die thermische Destabilisation der permanent ausgerichteten magnetischen Dipole in der Kristallstruktur. Ohne äußeres magnetisches Feld können sich die Dipole auf Grund ihres thermisch angeregten Zustandes nicht mehr ausrichten, und der Kristall besitzt kein resultierendes magnetisches Moment. Dementsprechend hat ein solcher Kristall keine permanente Magnetisierung. Superparamagnetisches Verhalten wird nur beobachtet, wenn die magnetischen Domänen physikalisch separiert sind und nicht wechselwirken können (Hülser 2003).

Als superparamagnetische Substanzen kommen u.a. kleine Eisenoxidkristalle wie Ferrite und Magnetite in Betracht. Ferrite sind Eisenoxidpartikel mit der Summenformel $\text{Fe}^{3+}_2\text{O}^{1-}_3\text{M}^{2+}\text{O}$, wobei M ein zweiwertiges Metallion wie beispielsweise Zink oder Mangan, aber auch zweiwertiges Eisen sein kann. Handelt es sich um zweiwertiges Eisen, so entstehen Magnetite, welche eine Untergruppe der Ferrite sind. Fe^{2+} ist das Metallion, die Summenformel ist dann Fe_3O_4 (Wang et al. 2001). Der Eisenoxidkern magnetischer Nanopartikel wird von einer Hülle umgeben, indem oberflächenaktive Substanzen an deren Oberfläche adsorbiert oder chemisorbiert werden (Günther 1996). Diese Hülle soll verhindern, dass die Partikel agglomerieren oder sedimentieren können. Durch die Hüllschicht erhöht sich der Gesamtdurchmesser der Partikel, welcher zusätzlich noch durch die Wasserbindungskapazität der Hüllmaterialien vergrößert wird. Daher wird der

Gesamtdurchmesser in wässriger Lösung als hydrodynamischer Durchmesser angegeben (Wang et al. 2001).

Als Hüllmaterialien der Nanopartikel können verschiedene Substanzen verwendet werden, für eine Anwendung im medizinischen Bereich müssen diese aber für den Menschen bioverträglich sein. Die Eisenoxidpartikel selbst sind gut bioverträglich. So besitzen beispielsweise dextranummantelte Magnetitpartikel keine messbare LD₅₀ (Babincova et al. 2000). Als Hüllmaterialien kamen bislang u.a. Polymere wie Dextran (Saini et al. 1987), Carboxydextran (Lawaczeck et al. 1997), Polyethylenglycol (Saeed et al. 1998), Stärke (Kreft et al. 1994) oder Albumin (Widder et al. 1987) zur Anwendung. Werden nicht Polymere, sondern Monomere wie Citrat als Hülle gewählt, so können noch kleinere Partikel hergestellt werden (Taupitz et al. 2000). Durch diese Hüllmaterialien werden zum einen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Partikel beeinflusst, zum anderen kann durch Modifizierung der Hülle eine Kopplung an andere Substanzen erfolgen.

In der Diagnostik pathologischer Prozesse werden magnetische Nanopartikel bereits seit einigen Jahren eingesetzt. Von großer Bedeutung ist ihr Einsatz als Kontrastmittel in der MRT. Hierbei werden die magnetischen Nanopartikel nach ihrer Größe in zwei Kategorien eingeteilt. Die erste Gruppe sind die so genannten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO) mit Partikeldurchmessern zwischen 50-150 nm. Die zweite Gruppe sind Partikel mit Durchmessern kleiner als 50 nm (Brigger et al. 2002), welche als USPIO bezeichnet werden. Beide Partikelgruppen bewirken überwiegend eine Signalminderung bzw. T₂-Verkürzung in der MRT. Der zugrunde liegende Mechanismus besteht darin, dass superparamagnetische Partikel als negative Kontrastmittel Störfelder erzeugen; die Dephasierung der Protonen erfolgt dadurch schneller, wodurch die T₂-Relaxationszeit verkürzt wird, was sich in einer Signalabnahme (Schwärzung) zeigt (Claaßen 2002). Der Einsatz von SPIO als Kontrastmittel für MRT-Untersuchungen von Milz und Leber beruht auf der Eigenschaft von Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS), unspezifisch Partikel aus dem Blut aufzunehmen (Hemmingsson et al. 1987, Saini et al. 1987). Bislang zugelassene MRT-Kontrastmittel für Leber und Milz sind Endorem® (seit 1994) und Resovist® (seit 2002), mit welchen sich Lebermetastasen und gering differenzierte Lebertumore, denen Makrophagen fehlen, gut darstellen lassen (Vogl et al. 1997, Kehagias et al. 2001). Auch Hepatitiden und Leberzirrhosen können mit Endorem® dargestellt werden

(Elizondo und Weissleder 1990). Magnetithaltige Kontrastmittel, mit denen die Darstellung der Leber möglich ist, eignen sich auch zur Kontrastierung der Milz, z. B. zur Darstellung von Milzlymphomen (Weissleder et al. 1987, 1988, 1989b). Die Phagozytose erfolgt bei größeren Partikeln schneller als bei kleineren Partikeln (Taupitz et al. 2003), es hat sich jedoch gezeigt, dass auch kleinere Partikel bei entsprechend höherer Dosierung zu einem nutzbaren Signalverlust in der Leber führen (Bremer et al. 1999). Kleinere Partikel (ca. 30 nm Durchmesser) wie die USPIO zeigen eine andere Organverteilung und haben so z. B. das Potenzial, die nicht-invasive Lymphknotendiagnostik zu verbessern (Weissleder et al. 1989a, Mühler et al. 1995) oder vulnerable atherosklerotische Plaques zu charakterisieren (Schmitz et al. 2001). Auch in anderen diagnostischen Bereichen wird der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln derzeit experimentell untersucht. So wurden bei In-vitro-Untersuchungen entzündliche Muskelareale mit Hilfe eines Komplexes, bestehend aus sehr kleinen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln, sogenannten MIONs und polyklonalem IgG dargestellt (Weissleder et al. 1991). Apoptotische Zellen ließen sich experimentell mit Konjugaten aus CLIO und Annexin V oder Synaptotagmin I markieren (Schellenberger et al. 2002, Zhang et al. 2002). Auch konnten bereits bei In-vitro-Untersuchungen magnetische Nanopartikel, mit spezifischen Antigenen versehen, an Erythrozyten (Tibbe et al. 1999), verschiedene Tumorzellen (Kularatne et al. 2002, Zigeuner et al. 2003) und Bakterien (Morisada et al. 2002) gebunden werden. Aber nicht nur für die genannten diagnostischen Zwecke können magnetische Nanopartikel verwendet werden, auch ihr Einsatz in der Tumorthherapie wird derzeit an zahlreichen Zentren erforscht und klinisch erprobt.

In der Therapie maligner Erkrankungen ist der Effekt einer Hyperthermie, dem therapeutischen Einsatz von Temperaturen zwischen 40-45°C in definierten Körperregionen, seit vielen Jahren bekannt (von Ardenne und Kirsch 1965). Bisher wurden zur Erzeugung der notwendigen hohen Temperaturen vor allem Ultraschall und Radiowellen verwendet.

Ein neuer Ansatz besteht nun darin, zytotoxische Temperaturen durch den Einsatz von Eisenoxidpartikeln zu erzeugen. Durch Applikation magnetischer Nanopartikel und anschließendes Anlegen eines MWF nehmen die Partikel Energie aus dem MWF auf und wandeln diese in Wärme um. Ein Ferrofluid kann somit eine wirksame Wärmequelle zur Zerstörung von Tumorzellen darstellen (Babincova et al. 2000). Als Mechanismus für die Erwärmung wird für superparamagnetische Partikel mit Größen

unter 100 nm die kinetische Erwärmung angeführt. Größere ferromagnetische Partikel können ebenfalls zur Vermittlung einer Hyperthermie angewendet werden, hier führt die hysteretische Erwärmung zu dem gewünschten Effekt (Taupitz et al. 2003). Der zugrunde liegende Aufheizmechanismus beruht bei den mehrdomänigen Partikeln auf so genannten Blochwandverschiebungen, und die aufgenommene Energie entspricht der von der Hystereseschleife umschlossenen Fläche (Smit und Wijn 1962). Bei eindomänigen Partikeln dagegen wird die Wärme durch Drehung des Magnetisierungsvektors (Néel-Mechanismus) (Kittel 1989) oder durch Rotationen der Partikel als Ganzes (Brown-Mechanismus) (Hanson 1991) erzeugt. Handelt es sich um räumlich fixierte Partikel, so kann sich nur die Magnetisierungsrichtung des Teilchens ändern (Néel 1949). Sind die Partikel frei beweglich wie in einem Ferrofluid, so kann zusätzlich die Beweglichkeit der Teilchen eine Rolle spielen. In einem Ferrofluid erfolgt die Relaxation nach dem Prozess, dessen charakteristische Zeit kürzer ist. Beide Zeiten variieren mit der Größe der Partikel, wobei die Brownsche Relaxationszeit linear mit dem Teilchenvolumen V ansteigt, während die Relaxationszeit nach Néel exponentiell in V ansteigt (Odenbach 2001). Die Brown-Relaxation spielt nur im flüssigen Aggregatzustand eine Rolle, während die Néel-Relaxation nicht abhängig vom jeweiligen Aggregatzustand des Ferrofluids ist (Tartaj et al. 2003).

Das Prinzip der Wärmebehandlung mit Hilfe von Eisenoxiden wurde schon in Experimenten von Gilchrist et al. (1957) als viel versprechend angesehen, mittlerweile existieren in diesem Zusammenhang zwei unterschiedliche Ansätze. Die sogenannte „magnetische Flüssigkeits-Hyperthermie“ (Jordan et al. 1996) beinhaltet die Erzeugung von Temperaturen zwischen 43-45°C mit magnetischen Partikeln, welche in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie zu einer Sensibilisierung und Abtötung der Tumorzellen führen (Berry und Curtis 2003). Der zweite Ansatz ist die magnetische Thermoablation, bei welcher durch die magnetischen Nanopartikel höhere Temperaturen bis zu 55°C erzeugt werden (Hilger et al. 2001). Beim Einsatz von Temperaturen bis 44°C besteht das Problem, dass sich die Hälfte der Tumorzellen von der Hitzeschädigung wieder erholt; daher ist es von Vorteil, weitaus höhere Temperaturen für die Abtötung von Tumorzellen einzusetzen (Hilger et al. 2001).

Bekanntermaßen ist das Ausmaß der Wärmegenerierung unter anderem abhängig von der Menge des im Tumorareal deponierten Eisens. In den bisherigen

Untersuchungen zur Thermoablation wurde das magnetische Material meist direkt intratumoral injiziert (Jordan et al. 1997, Hilger et al. 2002, Suzuki et al. 2003). Bei dieser Applikationsart sind aufwändige 3-D-bildgebende Systeme notwendig, um sicherzustellen, dass die Applikation des magnetischen Materials nur im Tumoreal erfolgt. Auch gestaltet es sich hierbei schwierig, das gesamte Tumoreal gleichmäßig mit Eisen zu beladen. Darüber hinaus ist diese Applikationsform nur bei unifokalen, oberflächlich liegenden Tumoren möglich, während tiefer liegende, multifokale Tumore nicht erreicht werden können. Daher ist es notwendig, andere Applikationswege zu finden.

Eine mögliche Applikationsform von magnetischen Nanopartikeln besteht in der intravenösen Gabe der Partikel. Die Partikel könnten nach der intravenösen Gabe dann z. B. durch Anlegen eines äußeren Magneten an die Zielregion dirigiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, spezifische Antikörper an die Nanopartikel zu koppeln, die - nach Applikation der Partikel - an Antigene, welche von Zellen in der Targetregion exprimiert werden, binden. Bislang beschäftigten sich nur einige Untersuchungen mit einer antikörpervermittelten Anreicherung von Magnetoliposomen und polyethylenbeschichteten Nanopartikeln an Tumorzellen (Shinkai et al. 1995 und 2001, Suzuki et al. 1995). Neben Tumorzellen selbst können auch die tumorversorgenden Endothelzellen zum Target für eine antikörpervermittelte Bindung gemacht werden. Endothelzellen befinden sich auf der luminalen Seite der Blutgefäße und stellen somit die erste Kontaktstelle für im Blut zirkulierende Nanopartikel dar. Tumore mit Durchmessern über 2 mm induzieren ein eigenes Gefäßsystem um ihre Blutversorgung zu gewährleisten (Hilger et al. 2004). Dementsprechend ist ein weiterer viel versprechender Angriffspunkt für eine Antigen-Antikörper-Bindung auch die Endothelzelle selbst, da die im Blut zirkulierenden Nanopartikel nicht erst das Gefäßsystem verlassen müssen, sondern ohne Umwege mit den Antigenen der tumorversorgenden Endothelzellen reagieren können.

Während über antikörpervermittelte Bindungen bereits vereinzelt Daten existieren, gibt es kaum Kenntnisse über die grundlegenden Wechselwirkungen von magnetischen Nanopartikeln mit Zellen. Daher wurden in dieser Arbeit mit einem grundsätzlichen Modell für die Markierung von Endothelzellen die Interaktion zwischen verschiedenen Ferrofluiden und Endothelzellen und die Auswirkungen dieser Bindung auf die Wärmegenerierung im MWF untersucht. Ob sich die magnetischen Nanopartikel tatsächlich an die Zellmembran von Endothelzellen

anlagern, soll in der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Darüber hinaus soll die Wärmeausbeute der mit den Ferrofluiden markierten Zellen bei Exposition im MWF erfasst werden. Es existiert kaum Datenmaterial über die Wärmeausbeute von mit Ferrofluiden markierten Zellen, die meisten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Temperaturanstieg nach Injektion von Ferrofluiden in Gewebe (Hilger et al. 2001). Welcher Temperaturanstieg mit den in dieser Arbeit verwendeten biokompatiblen magnetischen Nanopartikeln nach Bindung an Zellen erreicht werden kann, ist bislang nicht bekannt.

Bisher konnte in nur einer Untersuchung gezeigt werden, dass es möglich ist, mittels unspezifischer Bindung magnetische Nanopartikel auf der Oberfläche von Endothelzellen zu fixieren und dadurch bei Exposition im MWF auch einen geringen Temperaturanstieg (2 K) zu verzeichnen (Hilger et al. 2004). Es handelt sich bei diesem Ferrofluid um einen Prototyp des Kontrastmittels Resovist® (Weitschies 2004). Dieses Ferrofluid hat einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 60 nm und einen Kerndurchmesser von 3-15 nm.

Mittlerweile sind neuere Ferrofluide erhältlich, welche aus größeren Partikeln mit hydrodynamischen Durchmessern von 120-150 nm bestehen.

Ob sich mit diesen Ferrofluiden, welche aus magnetischen Nanopartikeln mit den genannten hydrodynamischen Durchmessern bestehen, ebenfalls eine unspezifische Bindung an Zellen erreichen lässt, und welche Erwärmungen bei Exposition im MWF generiert werden können, ist bisher nicht bekannt.

Für die unspezifische Bindung der magnetischen Nanopartikel an Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine kovalente Bindung verwendet, welche mit der so genannten Natrium-Perjodat-Methode hergestellt wurde. Die Perjodat-Oxidation wurde schon von Grimm et al. (2000) verwandt, um monoklonale Antikörper an die Dextranhülle von USPIO zu binden. Die Untersuchungen wurden mit der Endothelzelllinie SVEC4-10 durchgeführt, da Endothelzellen, wie bereits erläutert, in Hinblick auf eine spätere therapeutische Wärmebehandlung einen viel versprechenden Angriffspunkt darstellen.

Da der erreichte Temperaturanstieg bekanntlich von der Menge an gebundenen Eisen abhängig ist, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Heizleistung von Ferrofluiden die spezifische Absorptionsrate eingeführt. Die SAR ist die aufgrund magnetischer Verluste erfolgende Temperaturänderung innerhalb einer bestimmten Zeit bezogen auf eine definierte Masse Eisenoxid (Frühauf K. 2001).

Dementsprechend sind besonders Ferrofluide mit hohen SAR-Werten für eine Anwendung im Sinne einer Wärmebehandlung interessant. Zwar existieren in der Literatur Daten zur SAR verschiedener ferromagnetischer und superparamagnetischer Substanzen (Hergt et al. 1998, Hiergeist et al. 1999, Hilger et al. 2001), von den in dieser Arbeit verwendeten Ferrofluiden sind aber bislang keine SAR-Werte bekannt.

Betrachtet man die bei Ferrofluiden zur Erwärmung führenden beschriebenen Verlustprozesse nach Néel und Brown, so wird deutlich, dass die SAR eines nativen Ferrofluids durch beide Mechanismen bestimmt wird. Es ist aber nicht bekannt, inwiefern die SAR durch eine Bindung der Partikel an Zellen eine Veränderung erfährt. Bisherige Untersuchungen zeigten eine Änderung der SAR in Abhängigkeit vom umgebenden Medium (Hiergeist et al. 1999); die Auswirkungen auf die SAR durch eine Bindung an Zellen wurden bislang nicht untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Fragestellung behandelt, auf welche Weise sich die SAR nach Bindung an Zellen ändert. Im flüssigen Zustand eines Ferrofluids ist sowohl die Néel'sche als auch die Brown'sche Bewegung an der Wärmeentstehung beteiligt. Dies zeigen auch bisherige Untersuchungen zu den in einem Ferrofluid stattfindenden Rotationsprozessen. Hierbei war die SAR eines Ferrofluids im flüssigen Zustand bedeutend höher als die SAR des gleichen Ferrofluids nach Einbettung und Immobilisierung in einem Gel (Hergt et al. 2004b). Inwiefern sich diese Beobachtungen auf eine „Fixierung“ der magnetischen Nanopartikel durch Bindung an Zellen übertragen lässt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Bisherige Kenntnisse über die SAR von Ferrofluiden im unbeweglichen Zustand basieren auf Einbettung der Ferrofluide in einem Gel. Welchen Einfluss eine Bindung der Ferrofluide an Zellen auf die SAR hat, ist nicht bekannt. Ändern sich durch diese Bindung die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluide, so kann man davon ausgehen, dass sich dies auch in einer Veränderung der SAR zeigt.

In weiterführenden Experimenten soll zudem die Beweglichkeit der magnetischen Nanopartikel nach Bindung an Zellen durch eine Einbettung in ein visköses Medium weiter eingeschränkt werden. Ändert sich nach der Einbettung die SAR nicht, so zeigt dies, dass die magnetischen Nanopartikel bereits durch die Bindung an Zellen vollkommen unbeweglich waren. Nimmt die SAR nach der Einbettung weiter ab, so könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass vor der Einbettung noch eine Restbeweglichkeit der Teilchen vorhanden war.

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Ferrofluidproben hinsichtlich folgender Fragestellungen untersucht:

1. Bestimmung der Temperaturerhöhung bei Exposition der mit den magnetischen Nanopartikeln markierten Endothelzellen im magnetischen Wechselfeld
2. Bestimmung der spezifischen Absorptionsrate verschiedener magnetischer Nanopartikel vor und nach Bindung an Endothelzellen
3. Zusätzliche Einschränkung der Beweglichkeit der magnetischen Nanopartikel nach Bindung an Zellen durch Einbettung in ein visköses Medium und Überprüfung der Auswirkung der Einbettung auf die unter 1. und 2. beschriebene Fragestellung

3 Material und Methoden

3.1 Arbeitsutensilien

3.1.1 Chemikalien

- Aqua dest. (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
- Boran Dimethylamin (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Citronensäure Monohydrat (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Eosin B (Aldrich-Chemie, Milwaukee, USA)
- Essigsäure (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Ethanol in Aqua bidest. 70% (v/v) (Euroalkohol Vertriebsgesellschaft mbH, Nordhausen, Deutschland)
- Formaldehyd (Fischar GmbH Co KG, Saarbrücken)
- Hyaluronsäure (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Kaliumferrocyanid (Sigma Chemical, St. Louis, USA)
- Magnetische Nanopartikel (Innovent, Jena, Deutschland)
- Methanol 96% (v/v) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Natriumperjodat (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland)
- PBS 0,1M, pH 7,4 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- Salzsäure, 37% (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- SVEC4-10-Zelllinie (American Type Culture Collection, Manassas, USA)
- Trypanblau (Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland)
- Trypsin - EDTA 0,25% (GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Großbritannien)

Die für die einzelnen Experimente benötigten Lösungen sind im entsprechenden Abschnitt im Methodenteil aufgeführt.

3.1.2 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Abzug (Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland)
- Akku-Jet (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Atomabsorptionspektrometer (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland)
- Bechergläser (Schott, Mainz, Deutschland; VWR International GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland)
- Brutschrank Hera cell (Heraeus; Berlin, Deutschland)
- Bunsenbrenner (Heraeus; Berlin, Deutschland)
- Chamber Slide (Nalge Nunc International, Naperville, USA)
- Computer (Compaq, Dornach, Deutschland)
- Crushed Ice (Forschungszentrum Lobeda, Jena, Deutschland)
- Deckgläser 24 x 50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Digitalmultimeter HTML-2000 (Keithley, Ohio, USA)
- Eppendorfcups 1,5 ml (Eppendorf, Köln, Deutschland)
- FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Bedford, USA)
- Falcon Tubes (Greiner, Solingen, Deutschland)
- Feinwaage isocal AC 211 P (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop BX 50, Filter 470-490 nm (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- Generator zur Induktion von magnetischen Wechselfeldern, Frequenz 400 kHz, Amplitude 11 kA/m (EFD, Düsseldorf, Deutschland)
- Glaswolle (Forschungszentrum Lobeda, Jena, Deutschland)
- Induktor mit Spule Typ HFP 061/05 (EFD, Düsseldorf, Deutschland)
- Kammerobjektträger 21,6 x 45,7 mm (Chamber Slide™); (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Kryo-Behälter GT 38 (L'AIR LIQUIDES S.A., Düsseldorf, Deutschland)
- Kryo-Röhrchen 1,8 ml (Greiner, Solingen, Deutschland)
- Pasteurpipetten (D810, John Poulten LTD, Essex, Großbritannien)
- Phasenkontrastmikroskop Typ CK 40 (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen Fassungsvermögen: 10 µl, 50 µl, 100µl, 500µl, 1000µl (Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Pipettierhilfe 50µl, 100µl, 200µl (Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Plastikständer für Tubes (Neolab, Berlin, Deutschland)
- Reagenzgläser (Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland)

- Reinraumwerkbank (Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)
- Sephadex (Forschungszentrum Lobeda, Jena, Deutschland)
- Sigmaplot 4.0/ 8.0 (Jandel scientific, Middle Cove, Australien)
- Stickstofftonne Chronos (Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland)
- Testpoint (Jandel scientific, Middle Cove, Australien)
- Thermoelement, handgefertigt: Konstantandraht: $\varnothing = 0,16$ mm, Kupferdraht $\varnothing = 0,09$ mm (Herstellung und Kalibrierung: Frühauf S, 2001)
- Thoma-Zählkammer (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- Zentrifuge Biofuge primo (Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)
- Zellschaber (Greiner Bio-One GmbH Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland)

3.2 Zellkulturexperimente

3.2.1 Beschreibung der verwendeten Zelllinie

Alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit der Zelllinie SVEC4-10 durchgeführt. Die SVEC4-10-Zelllinie ist eine Endothelzelllinie, die durch den Simian Virus 40 (SV 40) in axillären Lymphknotenzellen von Mäusen zunächst transformiert und dann geklont wurde. Trotz der Transformation mit dem SV 40 entspricht die Physiologie der Zellen denen einer nicht-transformierten Endothelzelllinie (O'Connell und Edidin 1990).

Die Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche MHC-Klasse-I-Antigen und vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle. Darüber hinaus besitzen sie Rezeptoren mit einer hohen Affinität zu LDL (Walter-Yohrling et al. 2004). Die Zellen wachsen adhärent, und die Zeitspanne ihrer Verdopplungsrate beträgt zwischen 24 und 30 Stunden.

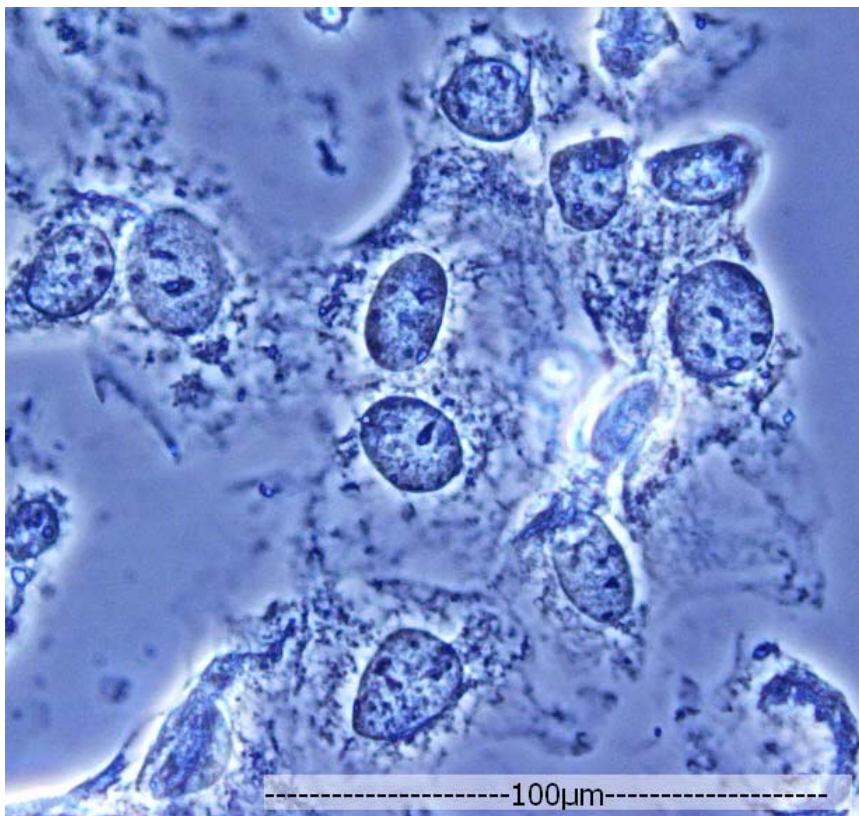


Abb. 2: Morphologie der SVEC4-10-Endothelzelllinie unter dem Phasenkontrastmikroskop mit 400-facher Vergrößerung (Meßbalken: 100µm).

3.2.2 Standardkulturbedingungen

Lösungen: Kulturmedium: Basismedium DMEM (GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Großbritannien) mit 10 % inaktivierten FKS (inaktiviert für 60 Minuten bei 56 °C); (GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Großbritannien)

Die Zelllinie wurde in Zellkulturflaschen mit Wachstumsflächen von 25 cm², 75 cm² oder 160 cm² kultiviert, mit jeweils 5 ml, 15 ml oder 30 ml Kulturmedium. Das Kulturmedium für die SVEC4-10-Zellen bestand aus DMEM mit 10% inaktiviertem FKS. Ein Mediumwechsel erfolgte in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen alle 1 bis 3 Tage. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C.

3.2.3 Subkultivierung der Zellen

Lösungen: Kulturmedium s. 3.2.2

Trypsin EDTA 0,25% (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)

Trypanblau-Stammlösung: 400 mg Trypanblau (Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland) in 100 ml PBS 0,1 M, pH 7,4 (filtriert)

Trypanblau-Gebrauchslösung: verdünnt 10:1 mit Zellsuspension

Die Zelldichte und Zellmorphologie wurden täglich unter einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Bei 80% bis 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Unter der Werkbank wurde dann das Kulturmedium abpipettiert und verworfen. Im Anschluss wurde dreimal mit PBS gespült, um alle Mediumreste zu entfernen, da das im Kulturmedium enthaltene FKS die nachfolgende enzymatische Ablösung durch Trypsin hemmt. Danach wurden 3 bis 5 ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank 3 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Um den Erfolg der enzymatischen Ablösung festzustellen, wurde anschließend noch eine morphologische Kontrolle unter dem Mikroskop durchgeführt. Zu den trypsinisierten Zellen wurde dann das Kulturmedium gegeben und mit der Pipette durch mehrmaliges Aufziehen gut suspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde nun in ein Falcon Tube transferiert und 5 Minuten lang bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in der erforderlichen

Mediummenge gelöst. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl der Zellsuspension in ein Eppendorfcup gegeben und mit 900 µl Trypanblaulösung vermischt. Die Trypanblaufärbung wurde durchgeführt, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Thoma-Zählkammer. Mit folgender Formel wurde die Gesamtzellzahl berechnet:

$$ZZ = \frac{ZZ \times V_m \times f}{V_t} = \frac{ZZ}{\text{ml}}$$

dabei sind:

- ZZ: Zellzahl
- V_m : Volumen der zu zählenden Suspension (100µl)
- V_t : Volumen der Zählkammer über dem Zählraster (0,064 µl)
- f: Verdünnungsfaktor

Nach der Zellzahlbestimmung wurde für die weitere Subkultivierung der Zellen die Zellsuspension auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

3.2.4 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Lösungen: Einfriermedium: Kulturmedium (s.3.2.2) mit 8% (v/v) DMSO (Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz)

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden aus der Stickstofftonne entnommen und zum Auftauen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann in eine bereits mit Kulturmedium versehene und vorgewärmte Zellkulturflasche gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische DMSO zu entfernen.

Um die Zellen einzufrieren, musste zunächst die bei der Subkultivierung erhaltene Zellsuspension 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert werden. Dann wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert und eine Zellzahl von 1×10^7 - $2,7 \times 10^7$ eingestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Kryoröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden daraufhin in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß gegeben, zunächst 15 Minuten bei 4°C gekühlt und anschließend 3 Tage bei -70 °C gelagert. Im Anschluss konnte der Transfer der

Kryoröhrchen in die Stickstofftonne erfolgen, wo die Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -190°C erfolgte.

3.2.5 Test auf Kontamination der SVEC4-10-Zellen mit Mycoplasmen

Lösungen: DAPI-Stammlösung: 5 µg DAPI (Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland) in 1 ml Aqua dest., Konz.: 14,3 µmol/l

DAPI-Gebrauchslösung: 0,2 ml Stammlösung in 9,8 ml Methanol, Konzentration: 0,28 µmol/l

Vor Beginn der Experimente wurden die Zellen auf Mycoplasmenbefall untersucht, um sicherzustellen, dass die Oberflächenstruktur der Zellen nicht durch diese Mikroorganismen beeinträchtigt wurde. Kontaminationen mit Mycoplasmen können rasch durch die Anfärbung der Mycoplasmen-DNA mit dem an DNA-bindenden Farbstoff DAPI nachgewiesen werden (Lindl und Bauer 1994). Hierzu wurde die beim Passagieren gewonnene Zellsuspension in die Kammern eines Chamber Slides gegeben (Zellkonzentration: $4-5 \times 10^5/\text{ml}$) und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach einem Tag wurde das Kulturmedium in dem Chamber Slide abpipettiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit der DAPI-Gebrauchslösung für 15 Minuten im Brutschrank. Danach wurde die Färbelösung abpipettiert, mehrmals mit PBS gewaschen, die Kammern des Chamber Slides mit einer Rasierklinge vom Objektträger gelöst und dieser mit einem Deckglas versehen. Nun konnte das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (Wellenlänge: 470-490 nm) und auf etwaige Mycoplasmenkontamination hin untersucht werden.

3.3 Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Ferrofluide

Chemikalien: verschiedene Proben von magnetischen Nanopartikeln des Herstellers Innovent, Jena, Deutschland

Die verwendeten Ferrofluide sind kolloidale Suspensionen magnetischer Nanopartikel, die sich auch nach langer Zeit nicht absetzen oder aggregieren, da ihre Hülle dafür sorgt, dass die Teilchen in der Suspension gehalten werden. In den Experimenten dieser Arbeit wurde mit 3 verschiedenen Ferrofluiden der Firma Innovent gearbeitet. Die verwendeten Ferrofluide bestehen aus Eisenoxidpartikeln, welche von einer Hülle aus langkettigen Zuckermolekülen (Carboxymethyldextrane) umgeben sind. Vom Hüllmaterial ist bekannt, dass es bioverträglich ist. Die in den Ferrofluiden vorliegenden magnetischen Nanopartikel haben einen Kerndurchmesser von ca. 10 nm. Ihr mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser liegt im Mittel bei 140 nm (Tab.1).

Tab. 1: Aufbau und Eigenschaften der untersuchten Ferrofluide

<i>Ferrofluid</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
Gesamt-Fe (in mg/ml)	55,4	74,0	52,0
Hydrodynamischer Partikeldurchmesser	142 nm	129 nm	151 nm
Hüllmaterial	CMD	CMD	CMD
pH-Wert in H ₂ O	5,9	5,3	4,5

3.4 Bestimmung der spezifischen Absorptionsrate

3.4.1 *Bestimmung des Masseanteils an Eisenoxid in den Ferrofluiden und in den mit Ferrofluiden markierten Messansätzen*

Für die Berechnung der SAR muss zunächst die in einer definierten Ferrofluidmenge enthaltene Masse an Eisenoxid bekannt sein. Die in dieser Arbeit verwendeten Ferrofluide sind Eisenoxidgemische aus Fe_3O_4 (Magnetit) und $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Maghemit), wobei der Hauptanteil von über 90 % aus Fe_3O_4 bestand (Kautz 2004). Da der überwiegende Teil der in den Ferrofluiden enthaltenen Eisenoxide in Form von Fe_3O_4 vorlag, wurde zur Vereinfachung der Anteil anderer Eisenoxide vernachlässigt und der Eisenoxidanteil in den Ferrofluiden auf der Basis von 100% Fe_3O_4 berechnet.

Unter der Voraussetzung, dass die Gesamtmasse des Magnetits sehr viel größer als die Gesamtmasse der die Magnetitpartikel umgebenden Hüllen ist, kann die Gesamtmasse des Magnetits wie folgt berechnet werden: Zunächst wurde im Institut für klinische Chemie mittels Flammenatomabsorptionsspektroskopie die Eisenkonzentration in den Ferrofluiden bestimmt. Das Prinzip der AAS beruht auf folgenden Mechanismen: In der Atomabsorptionsspektroskopie passiert ein Lichtstrahl die zu untersuchende Probe. Abhängig von der Konzentration des zu bestimmenden Elementes in der Probe wird ein Teil der Lichtintensität absorbiert. Zwei Photomultiplier messen die Intensität des Original-Lichtstrahls und des Lichtstrahls nach Verlassen der Probenzelle. Aus der Differenz der beiden Intensitäten kann die Elementkonzentration in der Probe berechnet werden.

Da mit der Eisenkonzentration auch die Eisenmasse m_{Fe} bekannt ist und von dieser angenommen wird, dass dieses Eisen ausschließlich in Form von Fe_3O_4 gebunden vorliegt, lässt sich mittels Gleichung (1) die entsprechende Masse an Sauerstoff m_{O} in einem bestimmten Ferrofluidvolumen berechnen (Kießling 2003). Aus der Sauerstoffmasse und der Eisenmasse, lässt sich dann mit Gleichung (2) die Eisenoxidmasse berechnen.

Berechnung der Sauerstoffmasse m_O in einem definierten Ferrofluidvolumen:

$$\frac{m_O}{m_{Fe}} = \frac{M_O \times n_O}{M_{Fe} \times n_{Fe}} \Rightarrow m_O = \frac{M_O \times n_O \times m_{Fe}}{M_{Fe} \times n_{Fe}} \quad (1)$$

M_O : Molare Masse von Sauerstoff

M_{Fe} : Molare Masse von Eisen

n_O : Stoffmenge von Sauerstoff im Fe_3O_4 -Molekül

n_{Fe} : Stoffmenge von Eisen im Fe_3O_4 -Molekül

m_{Fe} : Masse von Eisen (bestimmt mittels Flammen-AAS)

m_O : Masse von Sauerstoff

Die Masse von Fe_3O_4 lässt sich dann über die Gleichung (2) berechnen.

$$m_{Fe_3O_4} = m_O + m_{Fe} \quad (2)$$

$m_{Fe_3O_4}$: Masse von Magnetit in einem definierten Volumen

m_{Fe} : Masse von Eisen (bestimmt mittels AAS)

m_O : Masse von Sauerstoff (mittels Formel (1) berechnet)

Auf dieselbe Weise wurde mit diesen Gleichungen die Eisenoxidmasse in den Messansätzen, welche aus den mit magnetischen Nanopartikeln markierten Zellen bestanden, berechnet. Auch hierbei wurde von einem Eisenoxidanteil auf der Basis von 100 % Fe_3O_4 ausgegangen, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Untersuchungen der nativen Ferrofluide und den Untersuchungen der mit magnetischen Nanopartikeln markierten SVEC4-10-Zellen zu gewährleisten.

3.4.2 Temperaturmessung im magnetischen Wechselfeld

Die Temperaturmessung im magnetischen Wechselfeld erfolgte mittels eines Thermoelements aus Kupfer und Konstantandraht (Herstellung und Kalibrierung Frühauf S. 2001), welches so durch eine Pasteurpipette gezogen war, dass das eine Ende des Thermoelements ungefähr 0,5 cm aus der Pipette herausragte. Das andere Ende des Thermoelements wurde in eine mit Eiswasser befüllte Thermoskanne platziert. Nun wurde die Pasteurpipette so in einen Ständer eingespannt, dass der Teil des Thermoelements, welcher als Messfühler diente, im Mittelpunkt der Kupferspule zu liegen kam. Die zu messende magnetisch markierte Zellsuspension wurde in einem FACS-Röhrchen im Mittelpunkt der Spule angebracht. Die Isolierung der Probe wurde mit einem Styroporring, welcher zwischen Probe und Ständerarm eingeklemmt wurde, sichergestellt (Abb. 3).



Abb. 3: Versuchsaufbau zur Messung des Temperaturanstiegs von Ferrofluiden und von den mit Ferrofluiden markierten SVEC4-10-Zellen bei Exposition in einem externen magnetischen Wechselfeld. Dargestellt ist das Digitalmultimeter (1), welches zur Umwandlung von analogen Spannungssignalen in digitale Messwerte dient. In der mit Eiswasser befüllten Thermoskanne (2) ist ein Ende des Thermoelements platziert, während der Messfühler dieses Thermoelements sich direkt im zu untersuchenden Messansatz im Mittelpunkt der Kupferrohrspule (3) befindet.

Aufgrund der unterschiedlichen Temperatur von Probe und Eiswasser kommt es zum Aufbau einer Spannung, welche eine proportionale Funktion der Temperaturdifferenz ist und somit zur Temperaturmessung benutzt werden kann. Mit Hilfe eines Digitalmultimeters wurden die aufgezeichneten analogen Spannungswerte in digitale Signale umgewandelt, so dass diese Daten vom Computer weiterverarbeitet werden können. Mit den für jedes Thermoelement vorhandenen Kalibrierungsgleichungen (Frühauf S. 2001) und einem entsprechenden Auswertungsprogramm (Sigmaplot 4.0/8.0) kann aus den Spannungswerten die entsprechende Temperatur berechnet werden.

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchung wurde eine Kontrollmessung durchgeführt, die dazu diente, das thermische Gleichgewicht zwischen Raumtemperatur und Ausgangstemperatur der zu untersuchenden Zellsuspension herzustellen. Hierzu wurde das Messprogramm gestartet und ohne Spulenbetrieb die Temperatur der Zellsuspension aufgezeichnet. Erst wenn auf dem Computerbildschirm ersichtlich war, dass der Messansatz eine konstante Temperatur aufwies, wurde die Kühlung des Induktors zugeschaltet. Danach wurde erneut das Erreichen des thermischen Gleichgewichts abgewartet. Nun konnte die Messung begonnen werden, und die Daten wurden mit Hilfe des Messprogramms Testpoint akquiriert. Die Messdauer betrug 350 Sekunden, wovon in den ersten 50 Sekunden die Temperatur ohne Generatorleistung aufgezeichnet wurde. Dann wurde der Generator zugeschaltet und die elektrische Spannung über 250 Messzyklen gemessen, wobei eine Aufnahme der Messwerte alle 2 Sekunden erfolgte. Nach Abschaltung des Generators wurde außerdem noch die Abkühlung der Probe mit aufgezeichnet.

Mit Hilfe der aufgezeichneten Temperaturkurven kann nun auch die SAR berechnet werden. Die Temperatur des jeweiligen Messansatzes ist bei Beginn der Messung und ausgeschaltetem MWF im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung und unterliegt keinen zeitabhängigen Veränderungen. Wenn keine Wärmeabgabe an die Umgebung erfolgt, steigt die Temperatur nach Einschalten des MWF gemäß der Regressionsgeraden (b) an (Abb. 4). Nach Frühauf K. (2001) ist der Anstieg dieser Geraden, unter der Voraussetzung, dass alle anderen Faktoren konstant bleiben, proportional zu der gesuchten Leistung und geht unter Berücksichtigung der Gesamtmasse (m) des Messansatzes sowie der spezifischen Wärmekapazität (c) in die SAR-Berechnung mit ein.

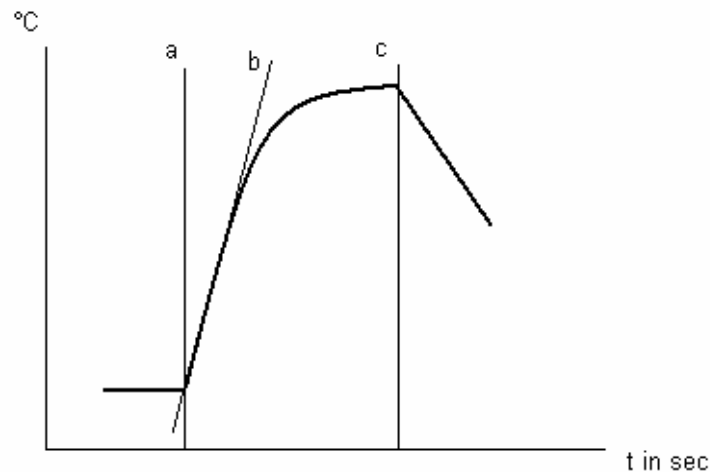


Abb. 4: Schematische Darstellung einer zeitabhängigen Temperaturkurve aufgenommen in einem MWF mit einer Feldstärke H von 11 kA/m und einer Frequenz von 400 kHz. Nach Erreichen des thermischen Gleichgewichts wird zum Zeitpunkt (a) der Generator zugeschaltet. Nach Abschalten des MWF (c) wird für weitere 100 Sekunden das Abkühlen mit aufgezeichnet. Eingezeichnet ist außerdem die an die Temperaturkurve angelegte Regressionsgerade (b).

Die SAR wird nun wie folgt berechnet:

$$\text{SAR} = \frac{P}{m_{\text{EO}}} = \frac{c \times M_{\text{FF}} \times \Delta T / \Delta t}{m_{\text{Fe}_3\text{O}_4}}$$

P: Leistung

m_{EO} : Masse des Eisenoxids (mittels Gleichung (2) berechnet)

m_{FF} : Masse von 100 µl des flüssigen Ferrofluids oder der mit Ferrofluid markierten SVEC4-10-Zellen (Mittelwert aus 10 Wägungen)

$\Delta T / \Delta t$: Anstieg der Regressionsgeraden

c: spezifische Wärmekapazität von Wasser ($= 4,184 \frac{\text{J}}{\text{g} \times \text{K}}$)

Mit dieser Formel wurden sowohl die SAR der nativen Ferrofluide als auch die der Ferrofluide nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen berechnet. Ausgehend von drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert mit Standardabweichung

berechnet. Um zu überprüfen, ob sich zwei Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein zweiseitiger t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte bei ungleichen Varianzen durchgeführt.

3.5 Markierung der SVEC4-10-Zellen mit magnetischen Nanopartikeln

Die unspezifische Bindung (Markierung) der verschiedenen Proben von magnetischen Nanopartikeln an die SVEC4-10-Zellen wurde mit der Natrium-Perjodat-Methode hergestellt. Mittels dieser Methode konnte eine unspezifische, nicht-antikörpervermittelte Bindung der magnetischen Nanopartikel an Zellen modelliert werden.

3.5.1 Chemische Kopplung der Ferrofluide an SVEC4-10-Zellen mit der Natrium-Perjodat-Methode

Lösungen: Citratpuffer, pH 5,0: Gebrauchslösung: 48,6 ml Stammlösung A und 51,4 ml Stammlösung B

Stammlösung A (0,1 M): 21,01 g Citronensäuremonohydrat in 1000 ml A. dest.

Stammlösung B (0,2 M): 28,39 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1000 ml A. dest.

Natrium-Perjodat-Lösung (0,35 M): 15 mg Natriumperjodat in 200 µl Citratpuffer

Boran-Dimethylaminlösung (150 mM): 8,838 mg Boran-Dimethylamin in 1 ml PBS (0,1M, pH 7,4)

48 Stunden vor Beginn der Experimente wurden die SVEC4-10-Zellen mit einer Zellzahl von $4,5 \times 10^6$ Zellen pro 125 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die erwartete Zellzahl nach zwei Tagen lag zwischen 2 und 3×10^7 Zellen.

Für die chemische Bindung wurde 1 ml des jeweiligen Ferrofluids abgenommen, mit 100 µl Natriumperjodat-Lösung versetzt und im Brutschrank bei 37°C für 40 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente der Aktivierung der Dextranhüllen der magnetischen

Nanopartikel. In der Zwischenzeit wurde eine große Pipettenspitze (Fassungsvolumen 5 ml) mit Glaswolle ausgestopft und mit Sephadex gefüllt. Diese Sephadexsäule wurde mit 20 ml PBS vorgespült; im Anschluss wurden die nun aktivierten magnetischen Nanopartikel aufgetragen und mit 2 ml PBS eluiert. Dieser Schritt diente zur Umpufferung des pH-Wertes des Ferrofluids auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4. Das gewonnene Haupteluat wurde dann im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt. Auf den gewaschenen Zellrasen wurden 3 ml des verdünnten Haupteluats und 3 ml PBS aufgetragen und für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen, die sich zum großen Teil schon von der Flasche gelöst hatten, mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in einem Falcon Tube aufgefangen. Anschließend wurde das Zellpellet in bis zu 10 Waschgängen mit PBS gewaschen, um das nicht an die Zellen gebundene Eisen möglichst vollständig zu entfernen. Der Überstand des letzten Zentrifugierdurchganges (im Weiteren Spüllösung genannt) wurde aufgehoben und im Anschluss einer Eisenmengenbestimmung mittels AAS im Institut für klinische Chemie unterzogen. Das mit magnetischen Nanopartikeln markierte Zellpellet konnte nun für die Temperaturmessung im MWF verwendet werden (s. 3.4.2).

Bei der chemischen Kopplung von Ferrofluid A an die SVEC4-10-Zellen wurde zusätzlich 5 Minuten vor Ende der Inkubationszeit Dimethylboran auf den Zellrasen gegeben, um die entstandenen kovalenten Bindungen zu stabilisieren.

3.5.2 Einfluss der bei der chemischen Kopplung stattfindenden Hüllenaktivierung der Ferrofluide auf die SAR-Berechnung

Lösungen: s. 3.5.1

Die Markierung der SVEC4-10-Zellen mit den in den verschiedenen Ferrofluiden enthaltenen magnetischen Nanopartikeln wurde durch Herstellung einer kovalenten Bindung zwischen den Carboxymethyldextranhüllen der Partikel und den Aminogruppen der Zelloberflächen erreicht. Hierbei erfolgte zunächst eine Aktivierung der Hüllen der magnetischen Nanopartikel durch Inkubation mit natriumperjodathaltigem Puffer. Um den Einfluss dieses Aktivierungsmittels auf das Verhalten der Ferrofluide im MWF zu ermitteln, wurde in einem Vorexperiment mit Natriumperjodat versetztes Ferrofluid C (im Weiteren aktiviertes Ferrofluid C

genannt) einer SAR-Bestimmung unterzogen und die Resultate mit den Ergebnissen des nichtaktivierten, nativen Ferrofluid C verglichen. Da die in den Ferrofluiden enthaltenen magnetischen Nanopartikel - trotz Unterschieden im Aufbau - das gleiche Hüllmaterial besitzen, wurde der Einfluss der Hüllenaktivierung beispielhaft an Ferrofluid C untersucht.

Hierzu wurden je 100 µl des nativen Ferrofluids C und des aktivierten Ferrofluids C verwendet und einer SAR-Bestimmung unterzogen. Zusätzlich wurde mit dem aktivierten Ferrofluid eine Eisenmengenbestimmung durchgeführt, da durch die Zugabe des Puffers eine Verdünnung des Ferrofluids erwartet wurde.

3.6 Einbettung der mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen in ein visköses Medium

Um zu überprüfen, ob die magnetischen Nanopartikel nach Bindung an die Zellmembran der SVEC4-10-Zellen fest und somit unbeweglich vorliegen, wurde in einer Zusatzuntersuchung eine Fixierung der Zellen in einer festen Matrix vorgenommen. Durch die Einbettung in ein visköses Medium wurde sichergestellt, dass die magnetischen Nanopartikel Energie nur durch Drehung des Magnetisierungsvektors gewinnen. Durch Vergleich mit den Daten der nicht-eingebetteten, an SVEC4-10-Zellen gebundenen Partikel lässt sich feststellen, ob sich das Verhalten der an die Zellen gebundenen Partikel nach der Einbettung im MWF in Bezug auf den Temperaturanstieg und die SAR-Berechnung ändert.

Dazu wurden exemplarisch $1,2 \times 10^7$ mit Ferrofluid C markierte SVEC4-10-Zellen verwendet und deren Temperaturanstieg und SAR mit der gleichen Anzahl nicht eingebetteter magnetisch markierter SVEC4-10-Zellen verglichen.

Um eine Immobilisierung des an die SVEC4-10-Zellen gebundenen Ferrofluids C zu erreichen, wurden die Zellpellets mittels Hyaluronsäure eingebettet. Dabei wurden die magnetisch markierten Zellpellets mit 1% Hyaluronsäure versetzt und zum Aushärten aufbewahrt. Die Temperaturmessung erfolgte nach 12 Stunden, nachdem die Probe ausgehärtet war.

3.7 Temperaturerhöhung nach Bindung der Ferrofluide an die SVEC4-10-Zellen bei Exposition im magnetischen Wechselfeld

Das Prinzip der Temperaturmessung wurde bereits unter 3.4.2 beschrieben. Die Änderungen, welche sich durch die Messung von mit magnetischen Nanopartikeln beladenen Zellen ergaben, werden nachfolgend behandelt.

Pro Ferrofluid wurden 3 Messansätze mit den mit Nanopartikeln markierten SVEC4-10-Zellen im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$) exponiert. Die Temperaturmessung erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben mit einem Thermoelement. Um sicherzustellen, dass der Temperaturanstieg tatsächlich durch die magnetisch markierten SVEC4-10-Zellen hervorgerufen wurde, wurden zusätzlich Kontrollmessungen durchgeführt: als ein Kontrollmessansatz wurde PBS allein gemessen, als weiterer Kontrollmessansatz wurde eine äquivalente Zellzahl in PBS im MWF exponiert und deren Erwärmung aufgezeichnet. So konnte ein Vergleich zwischen dem Temperaturanstieg von mit magnetischen Nanopartikeln markierten SVEC4-10-Zellen und dem der Kontrollmessansätze, welche kein magnetisches Material enthielten, hergestellt werden.

Nachdem die mit magnetischen Nanopartikeln markierte Zellsuspension auf ihre Erwärmung im MWF untersucht worden war, wurde im Anschluss der Eisengehalt der dabei entstandenen Messansätze analysiert. Zusätzlich wurde auch der Eisengehalt der untersuchten Kontrollmessansätze analysiert.

3.8 Berliner-Blau-Färbung nach Perls zum Eisennachweis in den SVEC4-10-Zellen

Lösungen: 10% Kaliumferrocyanidlösung: 20 g Kaliumferrocyanid auf 180 ml A.dest.

20% HCl-Lösung: 20 ml Salzsäure auf 17 ml A.dest.

0,1% Eosin-B-Lösung: 0,2 g auf 200 ml Aqua dest., anschließend gefiltert und mit einen Tropfen Essigsäure angereichert

Herstellung von 60%, 70%, 80% und 100% Ethanol: z.B. 60%: 60 ml Ethanol (96%) und 40 ml A.dest.

Die Berliner-Blau-Färbung wurde durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, dass eine Markierung der SVEC4-10-Zellen durch die magnetischen Nanopartikel erfolgt ist. Die Färbung wurde exemplarisch nach chemischer Bindung von Ferrofluid C an die SVEC4-10-Zellen durchgeführt. Vor der Färbung mussten zunächst die Objektträger mit Alkohol behandelt werden. Nach Kopplung von Ferrofluid C an SVEC4-10-Zellen und Entfernung des ungebundenen magnetischen Materials wurden Zellausstriche auf Objektträgern angefertigt. Die Zellausstriche wurden zuerst mit 5% Formaldehyd auf den Objektträgern fixiert und anschließend nach einem Färbeprotokoll (modifiziert nach Perls) behandelt (Tab.2). Nach dem Trocknen der Objektträger wurden diese mit einem Deckglas versehen und konnten unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Tab. 2: Modifiziertes Färbeprotokoll der Berliner-Blau-Färbung nach Perls zum Eisennachweis nach Markierung von Zellen mit magnetischen Nanopartikeln. Angefärbt wurden die SVEC4-10-Zellen nach chemischer Bindung von Ferrofluid C, um ihren Eisengehalt sichtbar zu machen. Dargestellt sind die verschiedenen Färbeschritte mit den jeweils benötigten Substanzen und der entsprechenden Inkubationszeit.

Substanz	Inkubationszeit
A. dest.	3 Minuten
10 %(v/v) Kaliumferrocyanidlösung	5 Minuten
1:1 gemischt: 20% HCl-Lösung und 10 % Kaliumferrocyanidlösung	30 Minuten
A. dest	3 x 5 Minuten
Eosin-B	10 Minuten
A. dest.	3 x 5 Minuten
60% Ethanol	2 Minuten
70% Ethanol	2 Minuten
80% Ethanol	2 Minuten
96% Ethanol	2 Minuten

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der SVEC4-10-Zellen auf Mycoplasmen

Der durchgeführte DAPI-Test fiel negativ aus. Bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 400-facher Vergrößerung zeigten sich die Zellkerne glatt begrenzt, rund und deutlich anfärbbar (Abb. 5). Es waren keine Schleier oder Kernreste erkennbar, wie es für einen Mycoplasmenbefall typisch ist. Auch die weiteren DAPI-Tests, welche routinemäßig durchgeführt wurden, fielen negativ aus.

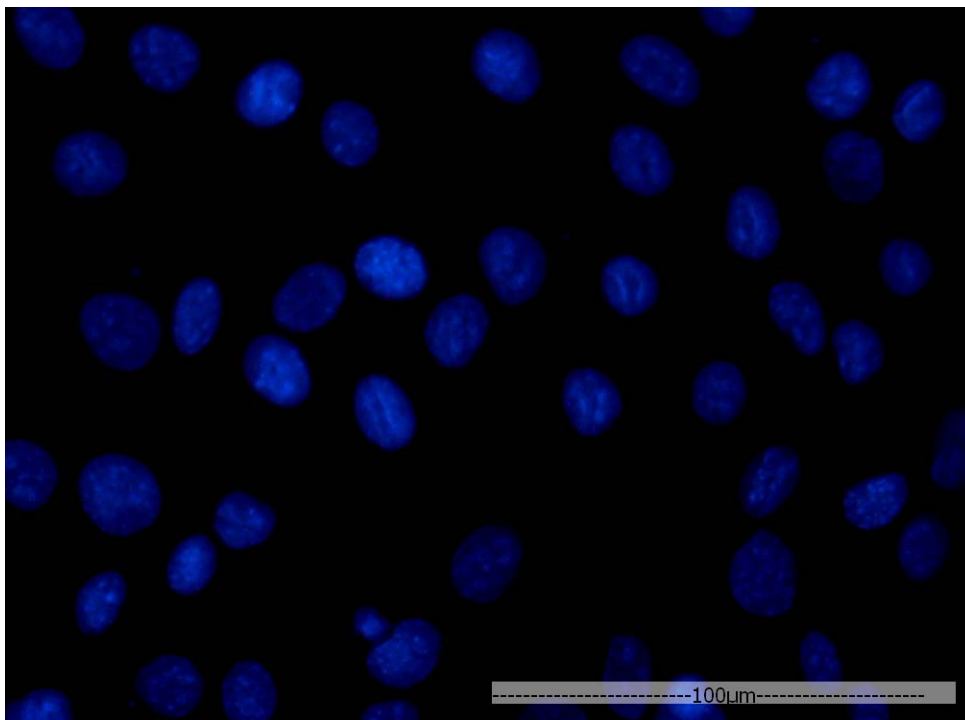


Abb. 5: Darstellung gesunder SVEC4-10-Zellen nach Anfärbung mit DAPI-Methanol betrachtet unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 400-facher Vergrößerung (Anregungswellenlänge: 470-490 nm). Gut zu erkennen sind die deutliche Abgrenzung des Zytoplasmas und die regelrecht geformten Zellkerne. Eine Mycoplasmenkontamination der verwendeten Zelllinie ist anhand dieser Aufnahme mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen (Meßbalken: 100µm).

4.2 Untersuchung von Ferrofluid A

4.2.1 Temperaturänderung von SVEC4-10-Zellen nach Markierung mit Ferrofluid A bei Exposition im magnetischen Wechselfeld

Nach Exposition der mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen (Zellzahl: 7×10^6 Zellen) in 50 μl PBS für 250 Sekunden im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$) wurde eine Temperaturerhöhung von $11,2 \pm 2,9 \text{ K}$ gemessen (Abb. 6). Unter identischen Messbedingungen erzielte eine Suspension aus 7×10^6 SVEC4-10-Zellen ohne magnetische Markierung in 50 μl PBS hingegen nur eine Temperaturerhöhung von $1,5 \pm 0,4 \text{ K}$, für 50 μl PBS allein wurden Werte von $0,7 \pm 0,1 \text{ K}$ gemessen (Abb. 6). Die Bindung der magnetischen Nanopartikel an die SVEC4-10-Zellen wurde durch Zugabe von Dimethylboran stabilisiert. Die mikroskopische Kontrolle nach der Inkubation zeigte Anzeichen einer Zellschädigung, welche auf das Dimethylboran zurückgeführt wurden, weswegen es in den weiteren Untersuchungen nicht mehr eingesetzt wurde.

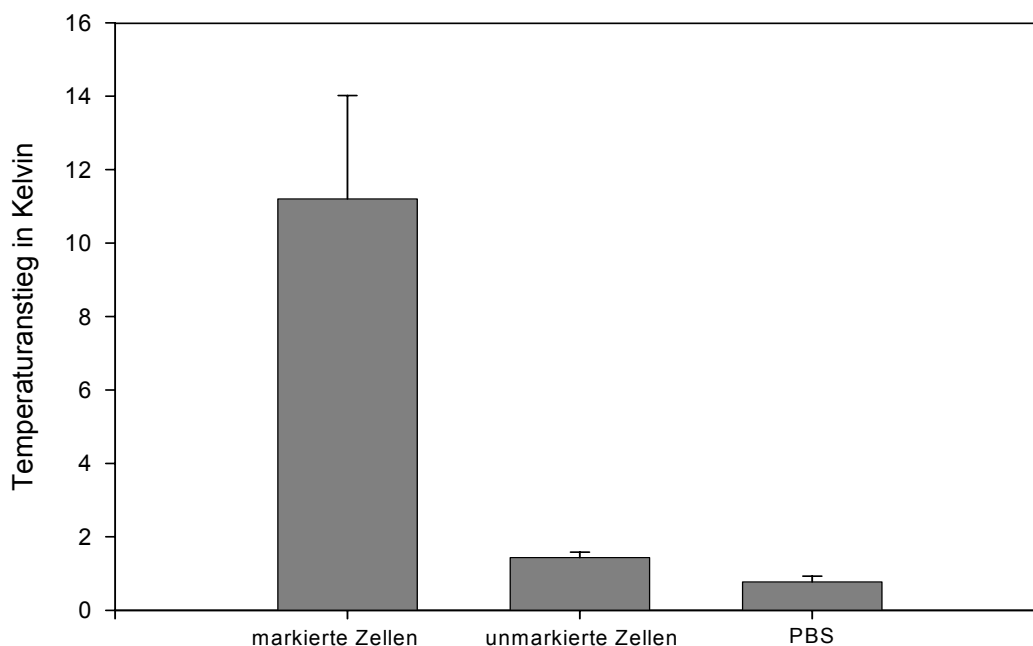


Abb. 6: Temperaturänderung nach Exposition der mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen für 250 Sekunden im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$). Dargestellt sind die Temperaturänderungen in K für 7×10^6 mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen in 50 μl PBS, 7×10^6 SVEC4-10-Zellen in 50 μl PBS ohne Ferrofluid und für 50 μl PBS allein. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.2.2 Analyse des Eisengehalts

Von allen Messansätzen einer Versuchsreihe wurde nach der Temperaturmessung eine Eisenmengenbestimmung durchgeführt.

Die Analyse der mit Ferrofluid A markierten Zellsuspensionen zeigte, dass die enthaltene Eisenkonzentration hierbei relativ hoch war und zwischen 0,21 und 0,26 mg/ml pro mit Ferrofluid A inkubierten Messansatz lag (Abb. 7). Zwar variierten die Zellzahlen geringfügig (zwischen 7×10^6 und 8×10^6), es konnte jedoch keine Abhängigkeit zwischen der Zellzahl und der enthaltenen Eisenmenge festgestellt werden. Umgerechnet auf die einzelne Zelle ergaben sich Eisenmengen zwischen 55 und 79 pg pro Zelle.

Die Analyse von unmarkierten SVEC4-10-Zellen in 50 μ l PBS ergab Eisenkonzentrationen zwischen $0,0006 \pm 0,00005$ mg/ml. Somit ist die Eisenkonzentration von unmarkierten Zellen um mehr als den Faktor 2500 geringer als die in den mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen. Die Eisenkonzentration in 50 μ l PBS allein ist bereits um den Faktor 6 geringer als im Kontrollmessansatz bestehend aus PBS und SVEC4-10-Zellen; sie beträgt $0,00001 \pm 0,000007$ mg/ml (Abb. 7). Die zusätzlich durchgeführte Analyse der Spüllösungen ergab sehr geringe Eisenkonzentrationen, welche zwischen 0,000035 und 0,00064 mg/ml lagen. Somit ist der Eisengehalt der Spüllösung um ein Tausendstel bis ein Zehntausendstel kleiner als im entsprechenden Messansatz (nicht dargestellt).

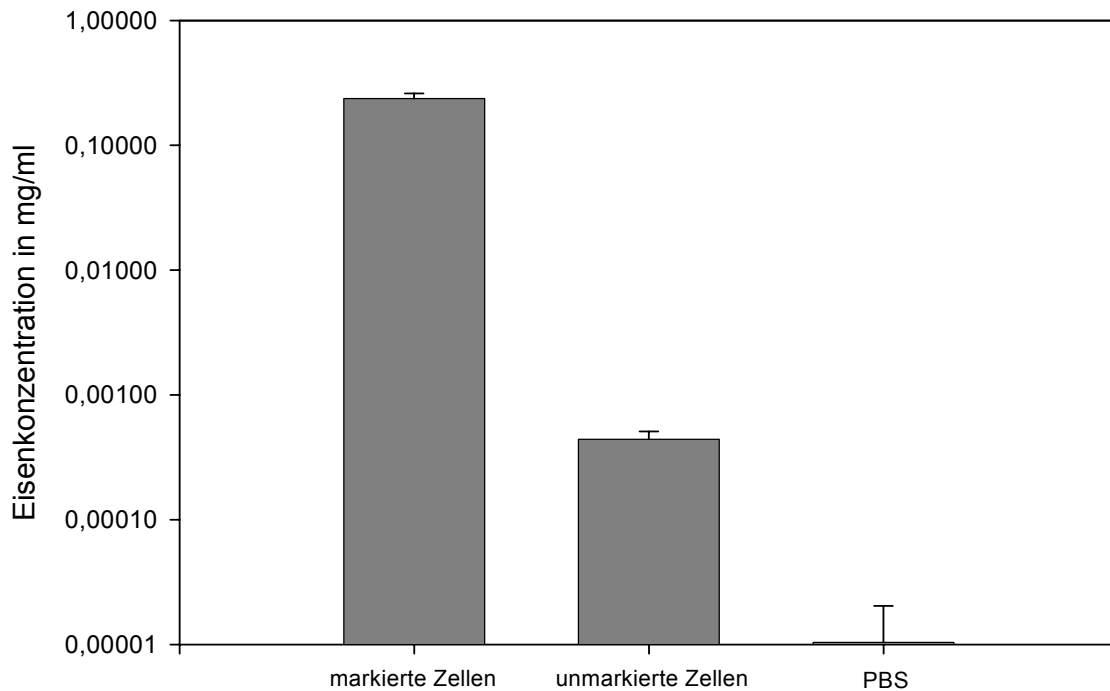


Abb. 7: Logarithmische Darstellung der Eisenkonzentration (in mg/ml) in den Messansätzen nach Markierung von SVEC4-10-Zellen mit Ferrofluid A. Es wurden 3 Messungen mit Zellzahlen zwischen 7×10^6 und 8×10^6 Zellen durchgeführt. Als Kontrollmessansätze wurden die gleichen Zellzahlen ohne Markierung mit Ferrofluid in 50 μ l PBS und 50 μ l PBS allein gemessen. Die Eisenmengenbestimmung wurde mittels AAS durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.2.3 SAR-Berechnung des nativen Ferrofluids A und nach Bindung von Ferrofluid A an die SVEC4-10-Zellen

Da der Eisengehalt des Ferrofluids bekannt ist (s. 3.3 Tab.1) konnte der für die SAR-Berechnung notwendige Massenanteil an Eisenoxid mit Hilfe der Gleichungen (1) und (2) aus Abschnitt 3.4.1 berechnet werden (Tab. 3).

Tab. 3: Darstellung der in die SAR-Berechnung eingehenden Parameter. Dargestellt sind sowohl die Daten für das native Ferrofluid (bezogen auf ein Volumen von 100 µl) als auch für mit magnetischen Nanopartikeln (Ferrofluid A) markierten Zellpellets (Volumen ca 120 µl).

	Natives Ferrofluid A	Ferrofluid A angelagert an Zellen
Gewicht des Messansatzes (Mittelwert aus 5 Wägungen)	0,106 ± 0,005 g	0,19 g
Masse an Eisenoxid im Messansatz	0,0076 g	0,68 ± 0,06 mg
Anstieg der Temperaturkurve	1,41 ± 0,16	0,122 ± 0,03

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Werte ergab die Berechnung der SAR des nativen Ferrofluids A 83 ± 10 W/g. Nach Bindung von Ferrofluid A an die SVEC4-10-Zellen ergab die SAR-Berechnung einen höheren Wert von 140 ± 29 W/g im Vergleich zum SAR-Wert des nativen Ferrofluids. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der SAR von Ferrofluid A im nativen Zustand und nach Bindung des Ferrofluids an die SVEC4-10-Zellen (Abb. 8).

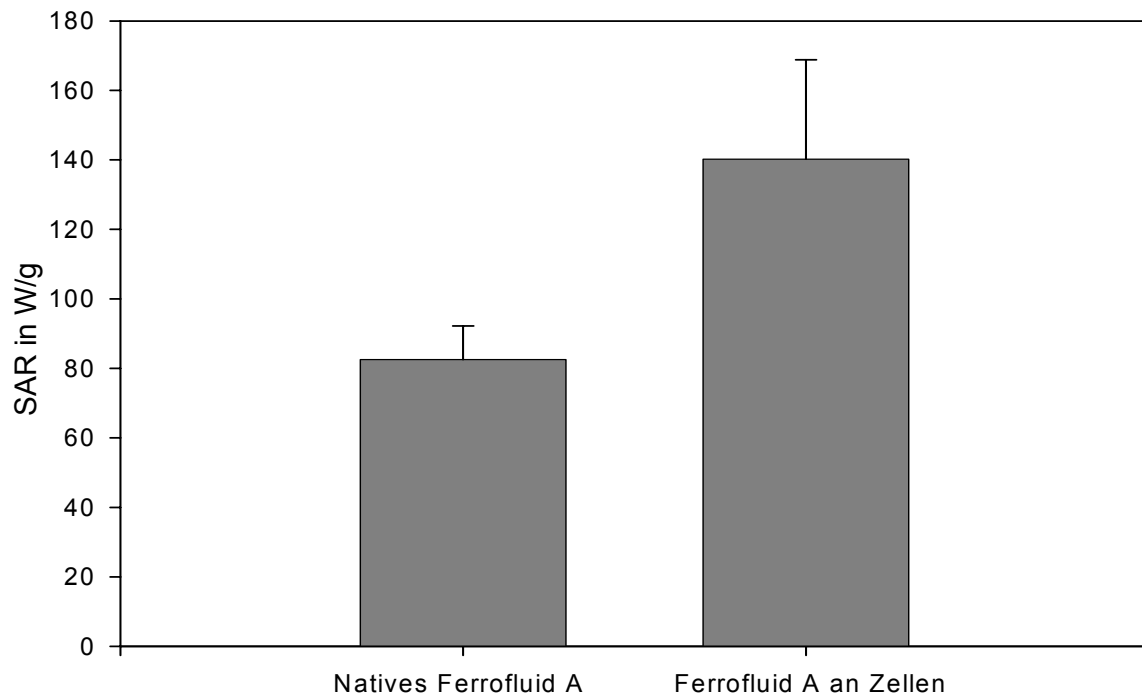


Abb. 8: SAR von nativem Ferrofluid A und nach Bindung von Ferrofluid A an die SVEC4-10-Zellen. Die SAR-Werte basieren auf Temperaturmessungen, welche in einem Magnetwechselfeld mit $H = 11 \text{ kA/m}$ und $f = 400 \text{ kHz}$ aufgezeichnet wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.3 Untersuchung von Ferrofluid B

4.3.1 Temperaturänderung von SVEC4-10-Zellen nach Markierung mit Ferrofluid B bei Exposition im magnetischen Wechselfeld

Nach Exposition der mit Ferrofluid B markierten SVEC4-10-Zellen (Zellzahl: $3,5 - 5 \times 10^6$) in $50 \mu\text{l}$ PBS für 250 Sekunden im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$) wurde eine Temperaturerhöhung von $5,7 \pm 1,8 \text{ K}$ gemessen (Abb. 9). Unter identischen Messbedingungen erzielte eine Suspension aus 4×10^6 SVEC4-10-Zellen ohne magnetische Markierung in $50 \mu\text{l}$ PBS hingegen nur eine Temperaturerhöhung von $1,3 \pm 0,2 \text{ K}$, für $50 \mu\text{l}$ PBS allein wurden Werte von $0,8 \pm 0,05 \text{ K}$ gemessen (Abb. 9).

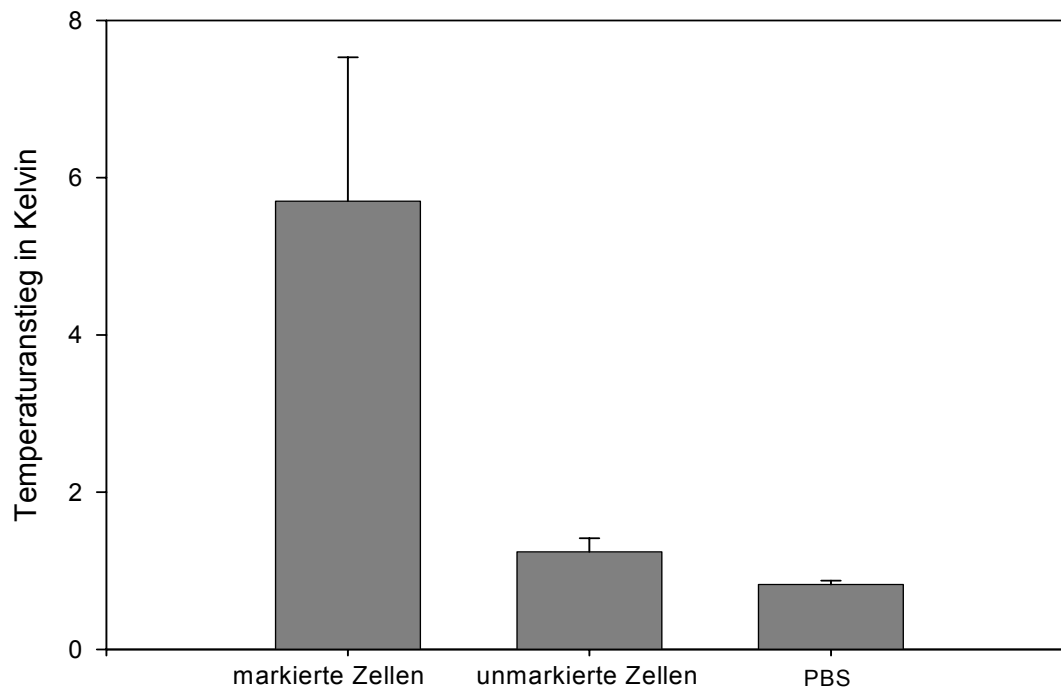


Abb. 9: Temperaturänderung nach Exposition der mit Ferrofluid B markierten SVEC4-10-Zellen für 250 Sekunden im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$). Dargestellt sind die Temperaturänderungen in K für $3,5 - 5 \times 10^6$ mit Ferrofluid B markierten SVEC4-10-Zellen in $50 \mu\text{l}$ PBS, 4×10^6 SVEC4-10-Zellen in $50 \mu\text{l}$ PBS ohne Ferrofluid und für $50 \mu\text{l}$ PBS allein. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.3.2 Analyse des Eisengehalts

Die Analyse der mit Ferrofluid B markierten SVEC4-10-Zellen ergab Eisenkonzentrationen zwischen $0,05 \pm 0,02$ mg/ml in den Messansätzen (Abb. 10). Erneut ließ sich keine direkte Abhängigkeit der enthaltenen Eisenkonzentration zur verwendeten Zellzahl feststellen. Umgerechnet auf die einzelne Zelle betrug die Eisenmenge $14,7 \pm 4,5$ pg, während sie nach Anlagerung von Ferrofluid A an Zellen mehr als viermal so hoch war. Die Analyse der unmarkierten SVEC4-10-Zellen ergab eine mittlere Eisenkonzentration von $0,0003 \pm 0,1$ mg/ml. Der Kontrollmessansatz mit PBS enthielt $0,00001 \pm 0,005$ mg/ml Eisen (Abb. 10). In den Spüllösungen nach chemischer Kopplung von Ferrofluid B fanden sich Eisenmengen zwischen 71,1 ng/ml und 292 ng/ml (nicht dargestellt).

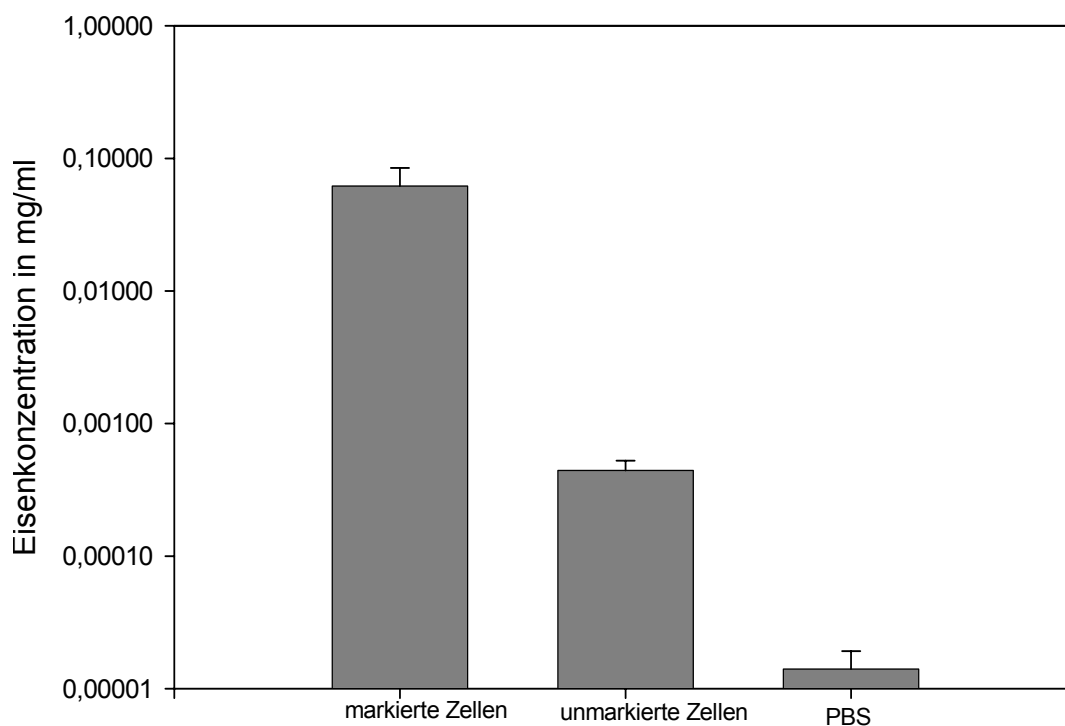


Abb. 10: Logarithmische Darstellung der Eisenkonzentration (in mg/ml) in den Messansätzen nach Markierung von SVEC4-10-Zellen mit Ferrofluid B. Es wurden 3 Messungen mit Zellzahlen zwischen $3,5$ und 5×10^6 Zellen durchgeführt. Als Kontrollmessansätze wurden die gleichen Zellzahlen ohne Markierung mit Ferrofluid in $50 \mu\text{l}$ PBS und $50 \mu\text{l}$ PBS allein gemessen. Die Eisenmengenbestimmung wurde mittels AAS durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.3.3 SAR-Berechnung des nativen Ferrofluids B und nach Bindung von Ferrofluid B an die SVEC4-10-Zellen

Da der Eisengehalt des Ferrofluids bekannt ist (s. 3.3 Tab.1) konnte der für die SAR-Berechnung notwendige Massenanteil an Eisenoxid mit Hilfe der Gleichungen (1) und (2) aus Abschnitt 3.4.1 berechnet werden (Tab. 4).

Tab. 4: Darstellung der in die SAR-Berechnung eingehenden Parameter. Dargestellt sind sowohl die Daten für das native Ferrofluid (bezogen auf ein Volumen von 100 μ l) als auch für mit magnetischen Nanopartikeln (Ferrofluid B) markierten Zellpellets (Volumen ca 120 μ l).

	Natives Ferrofluid B	Ferrofluid B angelagert an Zellen
Gewicht des Messansatzes (Mittelwert aus 5 Wägungen)	0,1048 \pm 0,005 g	0,15 g
Masse an Eisenoxid im Messansatz	0,0102 g	0,0882 \pm 0,0329 mg
Anstieg der Temperaturkurve	2,67 \pm 0,57	0,135 \pm 0,04

Die SAR des nativen Ferrofluids B betrug 125 ± 23 W/g, somit ist sie deutlich höher als bei Ferrofluid A. Nach unspezifischer Bindung von Ferrofluid B an die SVEC4-10-Zellen stieg die SAR um ein Vielfaches an und betrug 1028 ± 125 W/g (Abb. 11). Die SAR der magnetischen Nanopartikel im an die Zellen angelagerten Zustand ist somit mehr als 8-mal größer als die der nativen Partikel. Der Unterschied zwischen der SAR des nativen Ferrofluids und der SAR nach chemischer Bindung des Ferrofluids an die SVEC4-10-Zellen ist sowohl auf dem 5%-Niveau als auch auf dem 1%-Niveau signifikant (t-Test für ungleiche Varianzen).

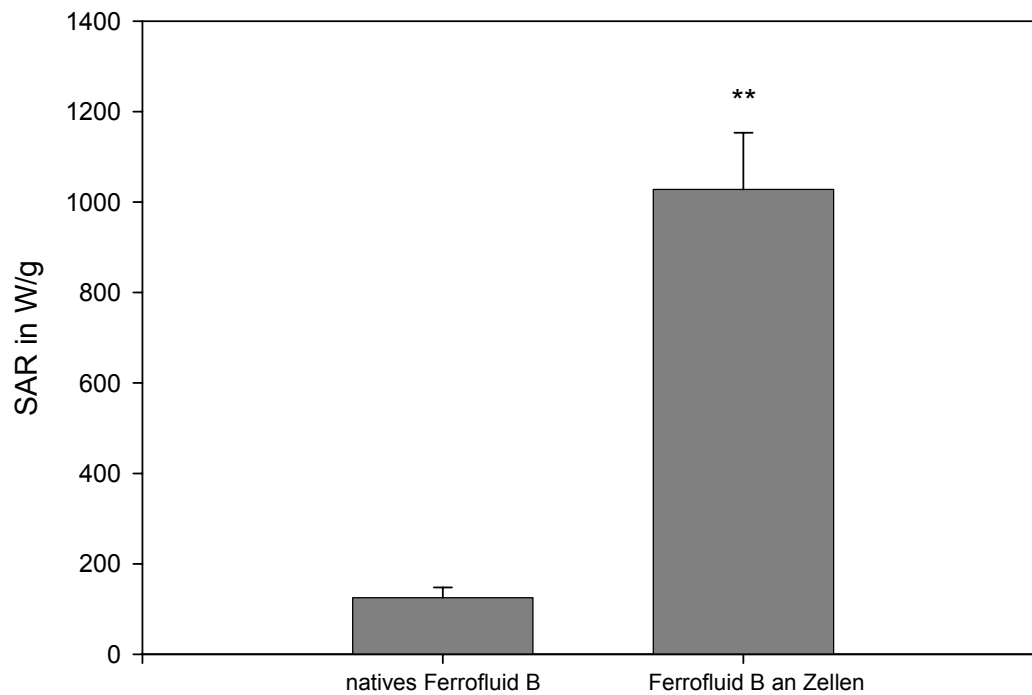


Abb. 11: SAR von nativem Ferrofluid B und nach Bindung von Ferrofluid B an die SVEC4-10-Zellen. Die SAR-Werte basieren auf Temperaturmessungen, welche in einem MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$) aufgezeichnet wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

****:** signifikanter Unterschied ($\alpha = 1\%$) zwischen der SAR des nativen Ferrofluids B und der SAR von Ferrofluid B nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen.

4.4 Untersuchung von Ferrofluid C

4.4.1 Temperaturänderung von SVEC4-10-Zellen nach Markierung mit Ferrofluid C bei Exposition im magnetischen Wechselfeld

Nach Exposition der mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen (Zellzahl: $1,4 - 1,9 \times 10^7$) in 50 μl PBS für 250 Sekunden im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$) wurde eine Temperaturerhöhung von $3,2 \pm 0,2 \text{ K}$ gemessen (Abb. 12). Die Temperaturmessung von ebenfalls mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen (Zellzahl: $1,5 \times 10^7$) und anschließender Einbettung in Hyaluronsäure erbrachte einen Temperaturanstieg von $2,5 \pm 0,4 \text{ K}$. Unter identischen Messbedingungen erzielte eine Suspension aus $1,5 \times 10^7$ SVEC4-10-Zellen ohne magnetische Markierung in 50 μl PBS hingegen nur eine Temperaturerhöhung von $1,6 \pm 0,4 \text{ K}$, für 50 μl PBS allein wurden Werte von $0,6 \pm 0,1 \text{ K}$ gemessen (Abb. 12).

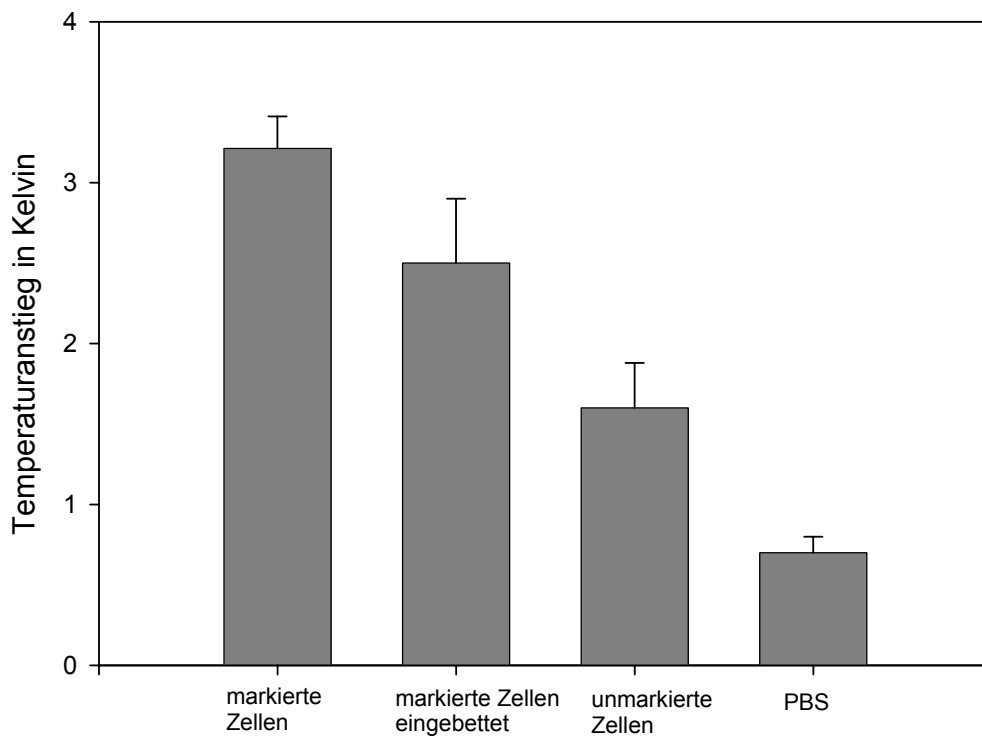


Abb. 12: Temperaturänderung nach Exposition der mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen für 250 Sekunden im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$, $f = 400 \text{ kHz}$). Dargestellt sind die Temperaturänderungen in K für $1,4 - 1,9 \times 10^7$ mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen in 50 μl PBS, $1,5 \times 10^7$ SVEC4-10-Zellen mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen und anschließender Einbettung in Hyaluronsäure. Als Kontrollmessansätze wurden unmarkierte Zellen (Zellzahl: $1,4 - 1,9 \times 10^7$) in 50 μl PBS und 50 μl PBS allein einer Temperaturmessung unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.4.2 Analyse des Eisengehalts

Die Analyse der mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen ergab Eisenkonzentrationen zwischen 0,02 und 0,15 mg/ml (Abb. 13). Umgerechnet auf die verwendete Zellzahl erhielt man Werte zwischen 3 und 16 pg Eisen/Zelle. Die Eisenkonzentration der eingebetteten magnetisch markierten Zellen unterlag ebenfalls einer großen Schwankungsbreite und betrug zwischen 0,03 und 0,19 mg/ml, womit sie fast genauso groß war wie die der magnetisch markierten Zellen ohne Einbettung. Die Eisenkonzentration der unmarkierten Zellen betrug $0,0005 \pm 0,00002$ mg/ml. Die Analyse von 100 μ l PBS lieferte Werte von $0,00005 \pm 0,000004$ mg/ml Eisen (Abb. 13). In den Spüllösungen nach Kopplung von Ferrofluid C an die SVEC4-10-Zellen fanden sich Eisenmengen zwischen 0,0004 und 0,0015 mg/ml (nicht dargestellt).

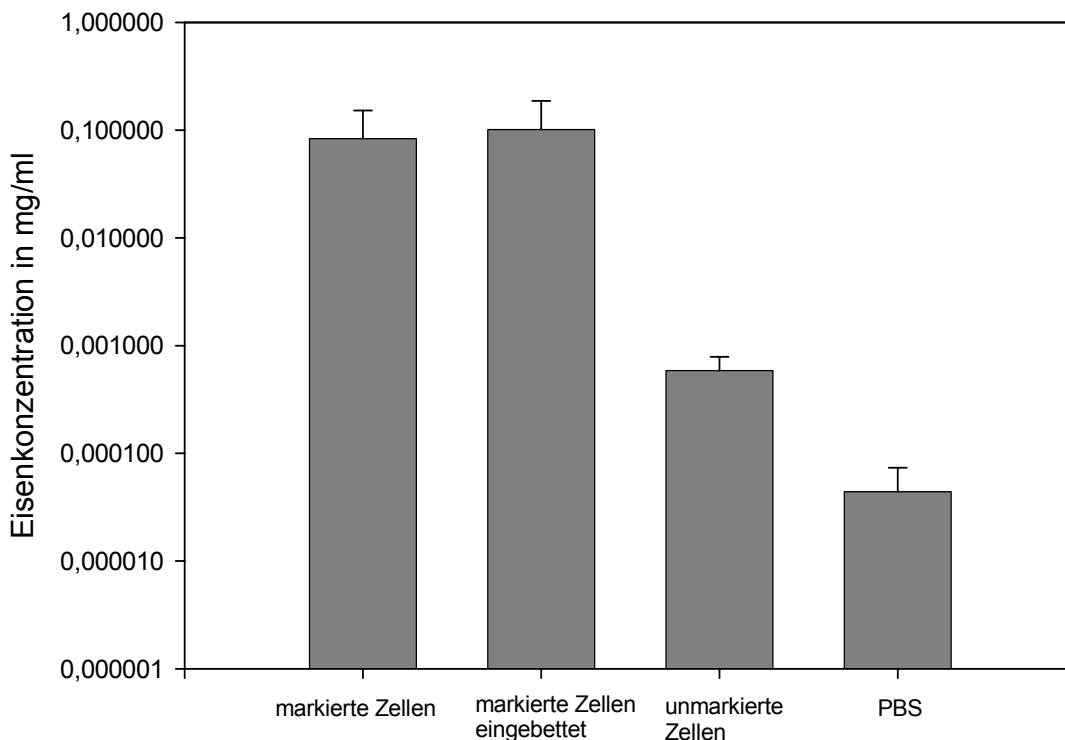


Abb. 13: Logarithmische Darstellung der Eisenkonzentration (in mg/ml) in den Messansätzen nach Markierung von SVEC4-10-Zellen mit Ferrofluid C. Es wurden 3 Messungen mit Zellzahlen zwischen $1,4 - 1,9 \times 10^7$ durchgeführt. Dargestellt ist außerdem die Eisenkonzentration von magnetisch markierten SVEC4-10-Zellen (Zellzahl: $1,4 - 1,9 \times 10^7$), welche zusätzlich in Hyaluronsäure eingebettet wurden. Als Kontrollmessansätze wurden die gleichen Zellzahlen ohne Markierung mit Ferrofluid in 50 μ l PBS und 50 μ l PBS allein gemessen. Die Eisenmengenbestimmung wurde mittels AAS durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

4.4.3 Auswirkung der Hüllenaktivierung der magnetischen Nanopartikel in Ferrofluid C auf die SAR-Messung

Die SAR des nativen Ferrofluids C ergab 92 ± 25 W/g; für die SAR des aktivierten Ferrofluids C wurde ein Wert von 109 ± 19 W/g ermittelt. (Abb. 14). Die Eisenmenge des nativen (nichtaktivierten) Ferrofluids C betrug 52 mg/ml, woraus sich mit Gleichung (1) und (2) gemäß 3.4.1 eine Eisenoxidmenge von 72 mg/ml errechnete. Nach Verdünnung mit Natriumperjodat des nun aktivierten Ferrofluids C ergab die Analyse mittels AAS eine Eisenmenge von 42 mg/ml, woraus sich mit Gleichung (1) und (2) gemäß 3.4.1 eine Eisenoxidmenge von 57 mg/ml errechnete. Bezüglich ihrer Masse und des Wertes der an die Temperaturkurve angelegten Regressionsgeraden bestehen nur geringe Unterschiede zwischen dem nichtaktivierten und dem aktivierten Ferrofluid C (Tab. 6).

Der t-Test zeigte, dass bezogen auf ihre SAR kein signifikanter Unterschied zwischen dem nichtaktivierten und dem aktivierten Ferrofluid C vorliegt.

Tab. 6: Daten zur Berechnung der SAR von Ferrofluid C im nichtaktivierten und im aktivierten Zustand. Die für die SAR-Berechnung notwendige Temperaturmessung im magnetischen Wechselfeld wurde jeweils mit 100 µl Ferrofluid durchgeführt.

	Masse von 100 µl Ferrofluid (Mittelwert aus 5 Wägungen)	Masse an Eisenoxid in 100 µl Ferrofluid	Anstieg der Temperaturkurve	SAR (in W/g)
nichtaktiviert	$0,116 \pm 0,014$ g	0,0072 g	$1,41 \pm 0,24$	92 ± 25
aktiviert	$0,111 \pm 0,006$ g	0,0057 g	$1,31 \pm 0,25$	109 ± 19

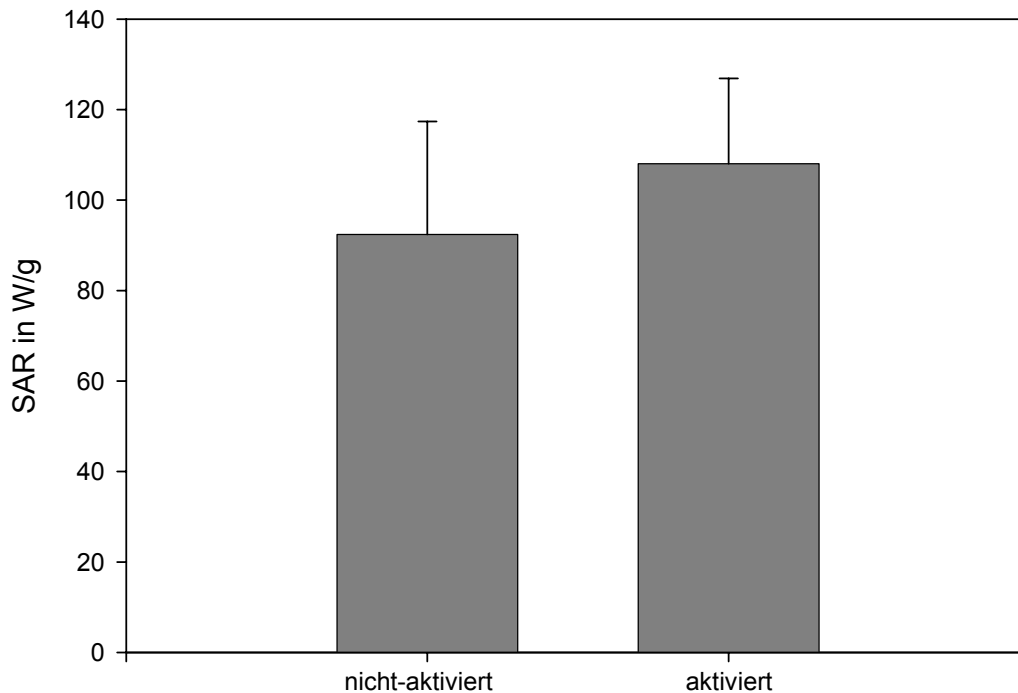


Abbildung 14: Gegenüberstellung der SAR von Ferrofluid C vor und nach der Hüllenaktivierung. Die Hüllenaktivierung erfolgte durch Zusatz von Natriumperjodat zu Ferrofluid C und nachfolgender Inkubation bei 37°C für 40 Minuten. Anhand von jeweils 3 Temperaturmessungen im MWF ($H = 11 \text{ kA/m}$ und $f = 400 \text{ kHz}$) wurde, wie unter 3.4.2 beschrieben, die SAR berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Messungen.

4.4.4 SAR-Berechnung von Ferrofluid C nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen und von Ferrofluid C nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen und zusätzlicher Einbettung

Da der Eisengehalt des Ferrofluids C bekannt ist (s. 3.3, Tab.1) konnte der für die SAR-Berechnung notwendige Massenanteil an Eisenoxid mit Hilfe der Gleichungen (1) und (2) aus Abschnitt 3.4.1 berechnet werden (Tab. 7).

Tab. 7: Darstellung der in die SAR-Berechnung eingehenden Parameter. Dargestellt sind sowohl die Daten für Ferrofluid C nach Anlagerung an SVEC4-10-Zellen als auch die Daten für mit Ferrofluid C markierten SVEC4-10-Zellen und zusätzlicher Einbettung.

	Ferrofluid C angelagert an Zellen	Ferrofluid C angelagert an Zellen und eingebettet
Gewicht der Zellpellets	0,15 g	0,20 g
Masse an Eisenoxid in den Messansätzen	0,053 ± 0,01 mg	0,015 ± 0,01 mg
Anstieg der Temperaturkurve	0,0395 ± 0,02	0,0353 ± 0,01

Die SAR nach Bindung von Ferrofluid C an die SVEC4-10-Zellen betrug 1213 ± 777 W/g (Abb. 15). Nach Einbettung von magnetisch markierten SVEC4-10-Zellen in Hyaluronsäure stieg die SAR auf einen Wert von $1417,7 \pm 666,9$ W/g an und war nur geringfügig höher als im nichteingebetteten Zustand. Die SAR des nativen und des aktivierten Ferrofluids sind ebenfalls in Abb. 15 dargestellt, die zugrunde liegenden Daten sind in 4.4.3 aufgeführt. Der Unterschied zwischen der SAR von Ferrofluid C, sowohl im nativen als auch im aktivierten Zustand, und der SAR nach chemischer Bindung von Ferrofluid C an SVEC4-10-Zellen ist sowohl auf dem 5 % - als auch auf dem 1%-Niveau signifikant (t-Test für ungleiche Varianzen).

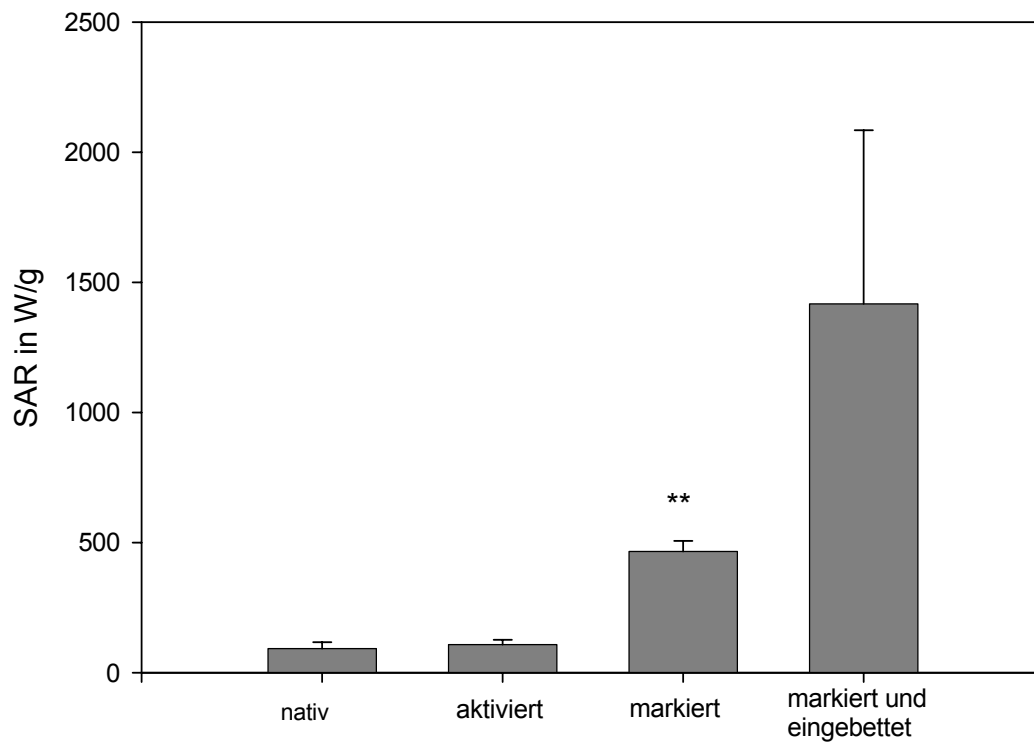


Abb. 15: Gegenüberstellung der SAR von Ferrofluid C im nativen und im aktivierten Zustand und nach Bindung von Ferrofluid C an die SVEC4-10-Zellen. Außerdem wurde die SAR nach Anlagerung von Ferrofluid C und nachfolgender Einbettung in Hyaluronsäure ermittelt. Die Werte beziehen sich auf MWF mit $H = 11 \text{ kA/m}$ und $f = 400 \text{ kHz}$. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

****:** signifikanter Unterschied ($\alpha = 1\%$) zwischen der SAR des nativen (nichtaktivierten) und des aktivierten Ferrofluids C und der SAR von Ferrofluid C nach Anlagerung an Zellen.

4.5 Nachweis der unspezifischen Bindung der magnetischen Nanopartikel an die SVEC4-10-Zellen mit der Berliner-Blau-Färbung

Mit der Berliner-Blau-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Markierung der SVEC4-10-Zellen mit Ferrofluiden möglich ist. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop mit 400-facher Vergrößerung waren trotz zahlreicher Waschgänge Eisenpartikel im angefärbten Zellausstrich nachweisbar. Das Eisen fand sich als blauer Saum an den SVEC4-10-Zellen. Außerdem konnten auch im Zytoplasma der Zellen einzelne dunkelblaue Partikel beobachtet werden. (Abb.16).

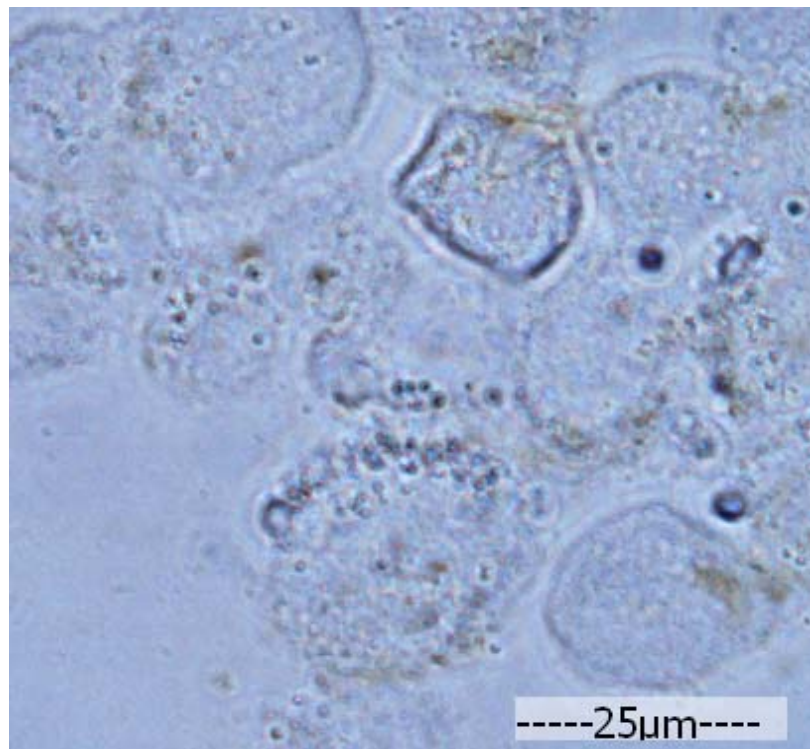


Abb. 16: Darstellung der SVEC4-10-Zellen nach chemischer Bindung von Ferrofluid C, angefärbt mit Berliner-Blau-Färbung (400-fache Vergrößerung). Das Eisen ist dunkelblau gefärbt und findet sich sowohl an der Oberfläche als auch im Zytoplasma der Zellen (Meßbalken: 25 μm).

5 Diskussion

Die Untersuchungen der verschiedenen Ferrofluide zeigten, dass sie sich ungeachtet ihrer vergleichbaren Eigenschaften unterschiedlich im Magnetwechselfeld verhalten. Bei der Exposition im Magnetwechselfeld von mit magnetischen Nanopartikeln markierten SVEC4-10-Zellen gab es in Abhängigkeit vom verwendeten Ferrofluid Unterschiede bezüglich des erreichten Temperaturanstiegs.

Bei der Berechnung der SAR zeigte sich, dass die SAR der nativen Ferrofluide zwar unterschiedliche Werte ergab, diese aber in derselben Größenordnung lagen. Nach Bindung der magnetischen Nanopartikel an die SVEC4-10-Zellen zeigte sich ein deutlicher Anstieg der SAR.

Im Einzelnen konnten bei den Erwärmungsexperimenten nach Bindung von Ferrofluid A an die SVEC4-10-Zellen hohe Temperaturanstiege gemessen werden ($11,2 \pm 2,9$ K). Hier stellt sich die Frage, ob dieser Anstieg tatsächlich durch an die Zellen gebundene Partikel oder durch im Messansatz vorliegendes freies Eisen hervorgerufen wurde. Zur Entfernung von ungebundenen Partikeln im Messansatz erfolgten zahlreiche Waschgänge vor der Exposition des Messansatzes im MWF. Die bei den Waschgängen entstandene Spüllösung zeigte eine Eisenkonzentration, welche um mehr als das Tausendfache geringer war als die Eisenkonzentration in den entsprechenden Messansätzen. Der Anteil von nicht entfernten freien Partikeln ist somit sehr gering. Daher ist die Temperaturerhöhung der mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf an Zellen gebundene magnetische Nanopartikel zurückzuführen. Auch die Spüllösungen nach der Inkubation von Ferrofluid B und C mit Zellen zeigten sehr niedrige Eisenkonzentrationen, woraus man folgern kann, dass auch bei diesen Erwärmungsexperimenten die Temperaturerhöhung auf an Zellen magnetische Nanopartikel zurückzuführen ist.

Der Temperaturanstieg der mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen weist im Vergleich zu den Kontrollmessansätzen, bestehend aus nicht markierten Zellen in PBS und PBS allein, einen signifikanten Unterschied auf. Die Erwärmung der Kontrollen (Zellen in PBS: $1,5 \pm 0,4$ K; PBS ohne Zellen: $0,7 \pm 0,1$ K) war um ein Vielfaches geringer als die der mit Ferrofluid A markierten Zellen ($11,2 \pm 2,9$ K). Dies bedeutet, dass die Markierung der SVEC4-10-Zellen mit dem Ferrofluid für den hohen Temperaturanstieg verantwortlich ist; ohne Markierung der Zellen zeigt sich

nur eine geringfügige Erwärmung bei Exposition im MWF.

Die Ursache der Wärmeentwicklung der unmarkierten SVEC4-10-Zellen im Suspensionsmittel PBS und des Suspensionsmittels PBS ohne Zellen ist sehr wahrscheinlich auf das Auftreten von Wirbelströmen zurückzuführen. Das Suspensionsmittel PBS ist ein Puffer, in welchem zahlreiche Ionen wie Chlorid oder Hydrogencarbonat gelöst sind. Bei Exposition im MWF kommt es in der Pufferlösung vermehrt zu Ionenbewegungen, was zu Reibungsverlusten führt, wodurch Wärme entsteht. Auf diesen Mechanismus ist der Temperaturanstieg der Kontrollen zurückzuführen.

Bei Betrachtung des Temperaturanstiegs von mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen muss daher berücksichtigt werden, dass ein gewisser Anteil der Erwärmung auf die im Messansatz enthaltenen Zellen bzw. auf das Suspensionsmittel PBS zurückzuführen ist. Allerdings beträgt dieser Anteil weniger als 2 K an der gesamten Erwärmung. Die gefundene Werte bestätigten die Untersuchung von Hilger et al. (2004), in welcher die Eigenerwärmung von Zellen in PBS $1,1 \pm 0,2$ K und von PBS allein $0,6 \pm 0,2$ K betrugen. In der genannten Untersuchung wurde ein Ferrofluid eines anderen Hersteller untersucht, welches andere Eigenschaften (z. B. kleineren hydrodynamischen Durchmesser, anderes Hüllmaterial) als die in dieser Arbeit untersuchten Ferrofluide hatte. Die Daten sind dennoch gut vergleichbar, da dieselbe Zelllinie verwendet wurde und die Parameter des MWF identisch waren ($H = 11$ kA/m, $f = 400$ kHz). Die etwas höhere Erwärmung der Kontrollmessansätze in der vorliegenden Arbeit ($1,5 \pm 0,4$ K bzw. $0,7 \pm 0,1$ K) liegt im Bereich der methodisch bedingten Schwankungen.

Der Temperaturanstieg von mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen beträgt nach Abzug der Erwärmung der Kontrollen nahezu 10 K, und ist somit tatsächlich auf die gebundenen magnetischen Nanopartikel zurückzuführen. Im Vergleich dazu fanden Hilger et al. (2004) bei der Exposition der mit einem Ferrofluid gekoppelten Endothelzellen einen Temperaturanstieg von 2 K. Bei diesem letztgenannten Temperaturanstieg ist bereits die Eigenerwärmung der Zellen mitberücksichtigt. In einer anderen In-vitro-Untersuchung konnte nach Einbettung von magnetischen Nanopartikeln in Agar nach 3 Minuten Expositionszeit ein Temperaturanstieg von weniger als 3 K gefunden werden (Shinkai et al. 1999).

Der Vergleich mit den in anderen Untersuchungen gemessenen Temperaturanstiegen zeigt deutlich, dass der Temperaturanstieg nach Bindung von Ferrofluid A

an Zellen vergleichsweise hoch ist. Im Vergleich zur gemessenen Erwärmung nach Bindung von Ferrofluid A an Zellen wurden bei den Erwärmungsexperimenten der Ferrofluide B und C geringere Temperaturanstiege gemessen (Ferrofluid B: $5,7 \pm 1,8$ K, Ferrofluid C: $3,2 \pm 0,2$ K). Erneut zeigt sich bei der Betrachtung der Kontrollmessansätze, dass die Erwärmung von Zellen in PBS und PBS allein unter 2 K beträgt. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten sind zuverlässig, da die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten relativ gering ist.

Die Temperaturmessung von mit Ferrofluid C markierten und zusätzlich eingebetteten SVEC4-10-Zellen zeigt zunächst, dass Hyaluronsäure einen geringen Einfluss auf die generierte Temperatur ausübt. Nach Einbettung in Hyaluronsäure ist der Temperaturanstieg von mit Ferrofluid C markierten Zellen etwas geringer als im nichteingebetteten Zustand, allerdings ist diese Differenz nicht signifikant. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Befunden aus der SAR-Bestimmung, welche weiter unten behandelt werden.

Betrachtet man die gemessenen Temperaturanstiege der verschiedenen Ferrofluide A, B und C nach unspezifischer Bindung an die SVEC4-10-Zellen, so reichen diese - ausgehend von einer Körpertemperatur von 37°C - theoretisch aus, um Tumore zu schädigen. Allerdings muss beachtet werden, dass diese Befunde auf In-vitro-Untersuchungen beruhen. Überträgt man die von Ferrofluid A, B und C erreichten Temperaturanstiege auf die In-vivo-Situation, müssen zusätzlich noch weitere Faktoren beachtet werden. Zunächst muss bei der In-vivo-Situation der Blutfluss berücksichtigt werden, durch welchen entstandene Wärme auch rasch wieder abtransportiert wird. Dieses Phänomen ist aus zahlreichen älteren Untersuchungen bei In-vivo-Hyperthermiebehandlungen bekannt (Boddie et al. 1986, Lagendijk et al. 1984, Anderson et al. 1994). Vor allem in gut vaskularisierten Organen wie z. B. der Leber stellt dies ein besonderes Problem bei einer Wärmebehandlung dar. Aus diesem Grund wird bei der Wärmebehandlung der Leber ggf. zusätzlich eine arterielle Embolisation durchgeführt, um die Abkühlung durch den Blutfluss zu reduzieren (Murata et al. 1998, Mitsumori et al. 1994). Ein Wärmeabtransport spielt bei weniger stark vaskularisierten Organen eine geringere Rolle. Aus diesem Grund ist zum Beispiel die Brust, welche weniger stark von Blutgefäßen durchzogen ist, für eine Wärmebehandlung besonders gut geeignet.

Der Temperaturanstieg von mit Ferrofluid A markierten SVEC4-10-Zellen beträgt nahezu 10 K, demgegenüber sind die Temperaturerhöhungen von mit Ferrofluid B

und C markierten SVEC4-10-Zellen niedriger. Die Ursache für den hohen Temperaturanstieg nach Markierung der Zellen mit Ferrofluid A ist wahrscheinlich in Zusammenhang mit der hohen Eisenmenge nach Bindung von Ferrofluid A zu sehen, welche weiter unten behandelt wird. Bei einer In-vivo-Anwendung müssen diese Temperaturanstiege auch in Anwesenheit des Blutflusses erreicht werden, um eine effektive Wärmebehandlung zu gewährleisten. Zu den für eine Wärmebehandlung benötigten Temperaturen existieren in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Bisher etabliert ist die Kombination von Temperaturen zwischen 40°C und 43°C und Strahlen- oder Chemotherapie zur Zerstörung von Tumorzellen (Wust et al. 2002). Neue tierexperimentelle Daten zeigen, dass eine Erwärmung auf über 42°C ohne Kombination mit einem anderen Therapieverfahren Tumore zerstören kann, jedoch währte die hierbei dargestellte Zeitspanne ohne ersichtliche Tumorregression nur 3 Monate (Matsuoka et al. 2004).

Das gewonnene Datenmaterial zeigt, dass von den untersuchten Ferrofluiden aufgrund ihres Temperaturanstiegs nach Bindung an Zellen, vor allem Ferrofluid A und B in Hinblick auf eine In-vivo-Anwendung interessant sind. Für eine Wärmebehandlung im Sinne einer magnetischen Thermoablation sind die erreichten Temperaturanstiege jedoch noch nicht ausreichend; einzig der Temperaturanstieg von mit Ferrofluid A markierten Zellen kommt in die Nähe der dafür benötigten Temperaturen. In Untersuchungen, in welchen das magnetische Material direkt intratumoral verabreicht wurde, konnten weitaus höhere Temperaturen erreicht werden (Hilger et al. 2002). Für zukünftige Wärmebehandlungen ist aber nicht die intratumorale Applikation von magnetischen Nanopartikeln, sondern eine antikörpervermittelte Bindung von Nanopartikeln in der Tumorregion von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit konnte mit einem Modell gezeigt werden, dass eine gezielte Bindung von magnetischen Nanopartikeln an die Endothelzelllinie SVEC4-10 möglich ist, und dass mit den unspezifisch gebundenen Nanopartikeln bei Exposition im MWF hohe Temperaturanstiege verzeichnet werden konnten. Es ist zu erwarten, dass bei einer antikörpervermittelten Bindung von magnetischen Nanopartikeln weniger magnetisches Material in der Targetregion gebunden werden kann, da die Anzahl von auf der Zelloberfläche exprimierten Antigenen begrenzt ist (Folkman 1996). Daher ist es notwendig, weiterhin nach Ferrofluiden mit einem hohen Wärmepotential zu suchen.

Die in dieser Arbeit beobachteten Temperaturanstiege sind abhängig von der Menge

an gebundenem Eisen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gesamteisenmenge nach Bindung von Ferrofluid A an Zellen am höchsten war ($0,24 \pm 0,02$ mg/ml). Dies deckt sich mit dem beobachteten hohen Temperaturanstieg bei diesem Ferrofluid. Nach Markierung der Zellen mit Ferrofluid B war die Gesamteisenmenge um eine Zehnerpotenz niedriger ($0,05 \pm 0,02$ mg/ml). Auch nach Bindung von Ferrofluid C an Zellen zeigte sich eine niedrigere Eisenmenge ($0,08 \pm 0,06$ mg/ml). Die relativ hohe Eisenmenge nach Bindung von Ferrofluid A im Vergleich zu den anderen Ferrofluiden ist wahrscheinlich bedingt durch die zusätzliche Stabilisierung der magnetischen Nanopartikel an der Zelloberfläche mit Dimethylboran. Durch die Zugabe von Dimethylboran wird die kovalente Bindung zwischen der Hülle der Nanopartikel und der Glykokalix der Zellen zusätzlich stabilisiert, wodurch mehr Nanopartikel an der Zelloberfläche gebunden werden als bei den anderen Ferrofluiden, was zu einem höheren Eisengehalt führt. Darüber hinaus sind die Bindungen zwischen den Partikeln und den Zellen so gefestigt, dass bei den nachfolgenden Waschgängen weniger Partikel entfernt werden als ohne Zugabe von Dimethylboran. Allerdings zeigt die mikroskopische Untersuchung nach der Zugabe von Dimethylboran, dass einige Zellen geschwollen waren, was auf die Zytotoxizität von Dimethylboran hinweist, weswegen es in den weiteren Untersuchungen nicht mehr eingesetzt wurde.

Bei Betrachtung des Eisengehalts nach Bindung von Ferrofluid B und C wird deutlich, dass der Eisengehalt mit einer hohen Standardabweichung verbunden ist. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Beispielsweise ist denkbar, dass die magnetischen Nanopartikel in unterschiedlichem Ausmaß in die SVEC4-10-Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Bei Betrachtung der Eisenmenge muss berücksichtigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist, dass die gefundene Eisenmenge nicht nur gebunden an der Zelloberfläche vorliegt, sondern sich auch endozytiert im Zellinneren befinden kann. Die Eisenmengenanalyse mittels AAS unterscheidet nämlich nicht zwischen endozytierten und an der Oberfläche gebundenen Partikeln, sondern ermittelt die Gesamteisenmenge nach Veraschung der Zellen. Somit kann die analysierte Eisenmenge sowohl durch magnetische Nanopartikel, welche gebunden an der Zelloberfläche vorliegen, als auch durch die Partikel, welche ins Zytoplasma aufgenommen worden sind, entstehen. Dies bestätigen Daten von Kießling (2003), der mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass sich ein Teil der von ihm untersuchten magnetischen

Nanopartikel nach unspezifischer Bindung an Endothelzellen im Zytoplasma der Zellen befand. Vergleichbare Hinweise finden sich auch bei Moore et al. (2000), welche bei In-vitro-Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien eine Endozytose von so genannten lang zirkulierenden monokristallinen Eisenoxidnanopartikeln (MION) nachwiesen. Sie untersuchten die Aufnahme von Nanopartikeln durch verschiedene Zelllinien nach Inkubation der Zellen mit MION in unterschiedlicher Konzentration. Die Aufnahme der Partikel variierte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der untersuchten Zelllinie; auch für die untersuchte SVEC4-10-Zelllinie konnten Endozytoseprozesse nachgewiesen werden. Aufgrund vergleichbarer Inkubationszeiten und ähnlicher Partikelgrößen wie in den beschriebenen Untersuchungen ist es wahrscheinlich, dass bei der Markierung der SVEC4-10-Zellen mit den magnetischen Nanopartikeln ebenfalls Endozytoseprozesse stattgefunden haben. Dies wird auch durch die angefertigte Berliner-Blau-Färbung nach Markierung der SVEC4-10-Zellen mit Ferrofluid C bestätigt: die Aufnahmen zeigen magnetisches Material sowohl an der Zelloberfläche als auch vereinzelt im Zellinneren.

Da die in dieser Arbeit untersuchten magnetischen Nanopartikel an ihrer Oberfläche keine spezifischen Liganden besitzen, spielen bei der Aufnahme der Partikel in die Endothelzelle am wahrscheinlichsten unspezifische Endozytoseprozesse im Sinne einer „coated pit“ Internalisierung die größte Rolle. In Übereinstimmung dazu beobachteten Moore et al. (1997), dass dextranumhüllte Nanopartikel vor allem mittels Pinozytose aufgenommen werden, während Partikel mit einer Proteinhülle eher über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle gelangen. Die in dieser Arbeit untersuchten magnetischen Nanopartikel besitzen eine Hülle aus Carboxymethyldextran. Mit diesen Partikeln konnte eine deutliche Markierung von Zellen erreicht werden. Ström et al. (2004) zeigten, dass Nanopartikel mit Carboxymethyldextranhülle stärker von Endothelzellen aufgenommen werden als Nanopartikel mit einer einfachen Dextranhülle. Die Inkubationszeit der magnetischen Nanopartikel mit den SVEC4-10-Zellen betrug in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine Stunde. Eine Steigerung der Internalisierung von Partikeln kann auch durch eine Verlängerung der Inkubationszeit erreicht werden (Berry et al. 2004). Da die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel eine Hülle aus Carboxymethyldextran besaßen, kann in Anlehnung an Ström (2004) davon ausgegangen werden, dass tatsächlich ein Teil der magnetischen Nanopartikel

endozytiert worden ist. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Eisenmengenanalyse nach Markierung der SVEC4-10-Zellen mit den verschiedenen Ferrofluiden sowohl für die magnetischen Nanopartikel an der Zelloberfläche als auch für die im Zellinneren gelten. Allerdings lässt sich keine quantitative Aussage über das Ausmaß an endozytierten magnetischen Nanopartikeln machen. Diese Quantifizierung bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Unter Einbeziehung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lässt sich die gebundene Menge an Eisen pro Zelle abschätzen. Die höchste Eisenmenge pro Zelle fand sich bei Ferrofluid A (71 ± 11 pg Eisen/Zelle), während sie nach Bindung von Ferrofluid B und C geringer war (Ferrofluid B: 14 ± 4 pg, Ferrofluid C: $1,0 \pm 0,6$ pg). Die nach Bindung von Ferrofluid A größte Eisenmenge pro Zelle ist, wie bereits erwähnt, auf die Stabilisierung der Partikel an der Zelloberfläche mit Dimethylboran zurückzuführen. Die Ursache für die unterschiedlich ausgeprägte Markierung der Zellen nach Inkubation mit Ferrofluid B und C ist ungeklärt, zumal die physikalischen Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel, wie z. B. der Kerndurchmesser vergleichbar waren.

In dieser Arbeit wurde eine Eisenmenge pro Zelle bis etwa 71 pg gefunden. Beim Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren zeigt sich, dass die Menge des an die Zellen gebundenen Eisens stark von den Versuchsbedingungen, dem experimentellen Aufbau und dem verwendeten magnetischen Material abhängt. So behandelten Suzuki et al. (1995) Tumorzellen mit antikörpergekoppelten magnetischen Nanopartikeln. Die anschließend durchgeführte AAS ergab einen Eisengehalt von 90 pg pro Zelle. Im Vergleich zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen war der Eisengehalt pro Zelle in der Untersuchung von Suzuki deutlich höher. Allerdings besaßen die von Suzuki et al. (1995) verwendeten Magnetoliposomen einen Kerndurchmesser von bis zu 100 nm, während der Kerndurchmesser der hier untersuchten Ferrofluide A, B und C um den Faktor 10 kleiner ist. Darüber hinaus war bei Suzuki et al. (1995) die Inkubationszeit deutlich länger als in der vorliegenden Arbeit. In einer weiteren Studie führten Shinkai et al. (1995) Untersuchungen mit Gliomzellen durch, an welche positiv geladene Magnetoliposomen gebunden wurden. Die Bindung an die Gliomzellen beruhte hierbei auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zelloberfläche der Gliomzellen und den positiv geladenen Magnetoliposomen. Als Resultat konnte eine Beladung von 55 pg Eisen pro Zelle festgestellt werden. Diese

unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass die Menge an gebundenem Eisen, zumindest unter In-vitro-Bedingungen, stark von den Eigenschaften der Partikel, der gewählten Inkubationszeit und nicht zuletzt von der Größe der magnetischen Nanopartikel abhängt.

Die Berechnung der SAR der Nanopartikel im nativen Zustand zeigte, dass die Ferrofluide A, B und C vergleichbare SAR-Werte aufwiesen: diese befanden sich in einer Größenordnung zwischen 83 ± 10 W/g (Ferrofluid A) und 125 ± 23 W/g (Ferrofluid B). Die SAR-Werte sind für die einzelnen Ferrofluide repräsentativ, da alle Untersuchungen dreimal durchgeführt wurden und darauf aufbauend die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen errechnet wurden. Die errechnete Standardabweichung fiel bei allen Ferrofluiden vergleichsweise hoch aus. Dies ist vermutlich auf Pipettierfehler zurückzuführen. Inwiefern hierfür andere Mechanismen verantwortlich sind, muss noch geklärt werden.

Die SAR-Werte der untersuchten Ferrofluide im nativen Zustand zeigen vergleichbare Werte. Dies liegt daran, dass die Partikelgröße und das Hüllmaterial der verwendeten Ferrofluide ähnlich sind. Bekanntermaßen hängt die Heizleistung und somit die SAR eines Ferrofluids vor allem von seiner Partikelgröße und Form ab, da diese die magnetischen Eigenschaften bestimmen. Darüber hinaus können Faktoren wie das Hüllmaterial und das Agglomerationsverhalten der Partikel die SAR beeinflussen (Hergt et al. 1998). Untersuchungen von Chan et al. (1993) zeigten, dass die SAR von Nanopartikeln stark durch das Hüllmaterial beeinflusst wird. Diese Beobachtungen werden von den hier vorliegenden SAR-Untersuchungen bestätigt.

Die höchste SAR wurde für Ferrofluid B (125 ± 23 W/g) bei Exposition im MWF ($f = 400$ kHz, $H = 11$ kA/m) errechnet. Auch im Vergleich mit den Daten anderer Autoren bestätigt sich, dass dieses Ferrofluid eine vergleichsweise hohe SAR aufweist. Hilger et al. (2002) untersuchten verschiedene Eisenoxide und fanden hier als höchsten SAR-Wert der Ferrofluide eine SAR von 93 W/g bei identischen Parametern des MWF. Kießling (2003) konnte mittels magnetischer Teilchengrößenseparation eine Steigerung der SAR von 92 W/g auf 173 W/g erreichen, da er Partikel mit einem geringeren Teilchendurchmesser aus seinem Ferrofluid entfernte und es somit zu einer engeren Verteilung der für die SAR bedeutsamen Partikeldurchmesser kam. Mit dem Verfahren der magnetischen Teilchengrößentrennung könnte bei den hier untersuchten Ferrofluiden voraussichtlich auch eine weitere Steigerung der SAR erzielt werden.

Die errechneten SAR-Werte dieser Arbeit basieren auf Messungen in einem MWF mit einer Feldstärke von 11 kA/m und einer Frequenz von 400 kHz. Eine weitere Optimierung der SAR könnte durch Veränderung der Parameter des MWF erreicht werden. Bekanntlich beeinflussen die Parameter des MWF neben den Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel die SAR (Hergt et al. 1998). Sehr hohe SAR-Werte von Ferrofluiden wurden von Hergt et al. (1998) beschrieben, die bei einer Magnetfeldstärke von 6,5 kA/m und einer Frequenz von 300 kHz für eine Magnetitprobe eine SAR von 45 W/g bestimmen konnten, welche durch eine Verdopplung der Magnetfeldstärke ($H = 14$ kA/m) auf 209 W/g anstieg. Diese Beobachtung bestätigen Untersuchungen von Lao und Ramanujan (2004), wonach sich eine Steigerung der SAR durch Veränderung der Magnetfeldparameter erreichen lässt. Dies zeigten auch Hiergeist et al. (1999), welche eine exponentielle Abhängigkeit der SAR magnetischer Materialien von der Magnetfeldstärke nachwiesen. Allerdings lassen sich diese Erkenntnisse nicht unbegrenzt auf eine biomedizinische Anwendung der magnetischen Nanopartikel umsetzen, da durch eine Erhöhung der Magnetfeldstärke und der Frequenz die Schädigungen für das umliegende gesunde Gewebe durch Wirbelströme stark ansteigen würden (Hergt et al. 2004a). Für eine Wärmebehandlung wird daher gefordert, Ferrofluide mit hohen SAR-Werten, bei für den Menschen gut verträglichen Parametern des MWF, zu finden (Hergt et al. 2004b, Bahadur und Giri 2003).

Die SAR von Ferrofluid C im nativen Zustand (90 ± 25 W/g) und nach Aktivierung der Hüllen der magnetischen Nanopartikel (109 ± 19 W/g) zeigt, dass sich die SAR durch die Zugabe von Natriumperjodat nicht signifikant ändert. Daraus ist ersichtlich, dass durch die Aktivierung der Hüllen zunächst keine veränderten magnetischen Eigenschaften der Ferrofluide entstehen. Im Gegensatz dazu weist Günther (1996) auf die Möglichkeit hin, dass es bei der Aktivierung der Absorptionshüllen von Ferrofluiden zur Ausbildung von verbrückten Agglomeraten zwischen den Partikeln kommen kann. Die ähnlichen SAR-Werte im nativen und im aktivierten Zustand aber zeigen deutlich, dass eine Agglomeratbildung der Partikel durch Zugabe des Aktivierungsmittels nicht erfolgt ist. Somit kann man davon ausgehen, dass die magnetischen Nanopartikel im beweglichen, nicht agglomerierten Zustand mit den Zellen inkubiert wurden.

Nach Bindung der magnetischen Nanopartikel an die SVEC4-10-Zellen steigt die SAR bei der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zur SAR der nativen

Nanopartikel an. Allerdings bestanden Unterschiede im Ausmaß des Anstiegs zwischen den verschiedenen Ferrofluiden. Während die SAR bei Ferrofluid A nach der Bindung nur geringfügig anstieg (140 ± 29 W/g), zeigte sich bei Ferrofluid B und C ein deutlicher Anstieg der SAR nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen. Der hierbei beobachtete Anstieg nach Bindung an Zellen zeigte sowohl für Ferrofluid B als auch C gegenüber dem nativen Wert einen signifikanten Unterschied der SAR auf dem 1%- Niveau an (t-Test für ungleiche Varianzen).

Der beobachtete Anstieg der SAR nach Bindung an die SVEC4-10-Zellen lässt zunächst erkennen, dass durch die Bindung an Zellen die magnetischen Eigenschaften verändert wurden. Somit wird die eingangs beschriebene Hypothese bestätigt, dass sich eine Änderung der magnetischen Eigenschaften in einer Änderung der SAR zeigt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht geklärt. Vermutlich kommt es zu einer Zusammenlagerung der Partikel nach der Inkubation mit den Zellen, was eine Vergrößerung des mittleren Partikeldurchmessers nach sich zieht, woraus sich eine veränderte SAR ergibt. Bekanntlich ist eine Veränderung der SAR durch einen veränderten Partikeldurchmesser möglich (Chan et al. 1993, Hergt et al. 1998, Hodenius 2002). Für eine genauere Analyse des Anstiegs der SAR nach Bindung an Zellen müssten Untersuchungen physikalischer Art folgen, in denen geklärt wird, ob die magnetischen Nanopartikel nach Bindung an Zellen andere magnetische Eigenschaften besitzen. Hergt et al. (2004a) weisen auch auf die Möglichkeit hin, dass eine Überlagerung von superparamagnetischen und ferromagnetischen Verlustprozessen zu höheren SAR-Werten führen kann als superparamagnetische Verlustprozesse allein. Um diese Aussage zu überprüfen, müssten weitere physikalische Untersuchungen vorgenommen werden, die das Verhalten der hier untersuchten magnetischen Nanopartikel genauer analysieren, damit man differenzieren kann, ob sich diese magnetischen Nanopartikel superparamagnetisch oder ferromagnetisch verhalten.

Eine weitere mögliche Ursache für den Anstieg der SAR nach Bindung an Zellen, kann auch auf die Endozytose der magnetischen Nanopartikel zurückzuführen sein, allerdings muss für eine genaue Einschätzung zunächst das Ausmaß von Endozytosevorgängen quantifiziert sein.

Die Einschränkung der Teilchenbeweglichkeit hat zu keiner signifikanten Änderung der SAR geführt. Dies zeigten die Untersuchungen der SAR nach Markierung von

Zellen mit Ferrofluid C und zusätzlicher Einbettung in Hyaluronsäure. Dies deutet darauf hin, dass bereits durch die Bindung der magnetischen Nanopartikel an die SVEC4-10-Zellen eine ausgeprägte Fixierung der Partikel stattgefunden hat, da ansonsten eine Abnahme der SAR zu erwarten gewesen wäre. Die SAR wird durch zwei Verlustprozesse bestimmt: zum einen kann die Wärme durch Drehung des Magnetisierungsvektors (Néel-Mechanismus) (Kittel 1989), zum anderen durch Rotationen der Nanopartikel als Ganzes (Brown-Mechanismus) (Hanson 1991) erzeugt werden. Handelt es sich um räumlich fixierte Partikel, so kann sich nur die Magnetisierungsrichtung des Teilchens ändern (Néel 1949). Sind die magnetischen Nanopartikel bereits durch die Bindung an Zellen unbeweglich, können die magnetischen Nanopartikel nicht mehr rotieren; der Brown-Mechanismus spielt demnach keine oder nur noch eine zu vernachlässigende Rolle. Dementsprechend ändert sich durch die Einbettung der an die Zellen gebundenen magnetischen Nanopartikel in Hyaluronsäure das Verhalten der Partikel nicht mehr, da diese bereits durch die Bindung an die SVEC4-10-Zellen nicht mehr als Ganzes rotieren können.

Anhand der Vorexperimente konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung der Nanopartikel durch Natriumperjodat keine veränderte SAR entsteht. Daraus lässt sich ableiten, dass erst bei der Inkubation der Partikel mit den SVEC4-10-Zellen definierte Effekte wirksam werden, welche einen Anstieg der SAR bewirken.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde ein Anstieg der SAR nach Bindung an Zellen gefunden. Diese Beobachtungen werden bestätigt von einer Untersuchung, in welcher auch ein Anstieg der SAR nach Einbettung der magnetischen Nanopartikel in ein Gel beobachtet wurde (Frühauf K. 2001). Im Gegensatz hierzu wurde für verschiedene Ferrofluide ein Abfall der SAR nach Einbettung beschrieben (Hergt et al. 1998). Während in der vorliegenden Arbeit die Immobilisierung der Partikel durch Bindung an Zellen erreicht wurde, wurden in den genannten Untersuchungen die Partikel in ein Agarosegel oder ein anderes visköses Medium eingebettet. Ein Abfall der SAR nach Einbettung der magnetischen Nanopartikel in ein visköses Medium kann darauf zurückgeführt werden, dass im fixierten Zustand die Brown'sche Teilchenbewegung keinen Beitrag zur SAR mehr leisten kann. Da aber die Brown'sche Teilchenbewegung auch durch die Bindung der magnetischen Nanopartikel an Zellen ausgeschaltet ist, müssen andere Mechanismen eine Rolle spielen, welche die beobachtete Zunahme der SAR nach Bindung an Zellen erklären

können. Hierfür müssen in weiterführenden physikalischen Untersuchungen die magnetischen Eigenschaften der Partikel nach Bindung an Zellen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Ferrofluide mit hydrodynamischen Durchmessern bis 150 nm an Endothelzellen zu binden. Mit dem vorliegenden Modell der Zellmarkierung konnte die Endothelzelllinie SVEC4-10 mit magnetischen Nanopartikeln markiert werden; die Markierung der Zellen führte bei Exposition im MWF zu einem Temperaturanstieg. Die Erwärmung variierte in Abhängigkeit von den verschiedenen Ferrofluiden. Durch die Bindung an die SVEC4-10-Zellen ändern sich die magnetischen Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel, was sich in einer Veränderung der SAR widerspiegelt. Anhand der ermittelten SAR-Werte konnte darüber hinaus eine weitere Selektion der Ferrofluide erfolgen, wobei sich besonders das Ferrofluid B mit seiner hohen SAR für weiterführende Untersuchungen anbietet. Auf lange Sicht sollen die in dieser Arbeit gefundenen Grundlagen dazu dienen, magnetische Nanopartikel nicht nur unspezifisch an Zellen zu binden, sondern auch eine antikörpervermittelte Bindung zwischen magnetischen Nanopartikeln und Endothelzellen herzustellen. Dass durch eine Bindung der magnetischen Nanopartikel an Endothelzellen ein Temperaturanstieg bei Exposition im MWF generiert werden kann, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Für eine antikörpervermittelte Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Zellen müssen an der Oberfläche der magnetischen Nanopartikel funktionalisierte Gruppen gebunden werden, welche gezielt an Endothelzellen in der Targetregion binden. Hierfür ist nicht nur eine optimale Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche notwendig, es müssen außerdem weitere Ferrofluide mit einem hohen Wärmepotenzial gefunden werden, damit nach Bindung der magnetischen Nanopartikel an Zellen ausreichend hohe Temperaturen für eine Wärmebehandlung von Tumoren generiert werden können.

6 Literaturverzeichnis

Anderson G, Ye X, Henle K, Yang Z, Li G. 1994. A numerical study of rapid heating for high temperature radio frequency hyperthermia. *Int J Biomed Comput*, 35: 297-307.

von Ardenne M, Kirsch R. 1965. On the methodology of extreme hyperthermia, with special reference to multi-step cancer therapy. *Dtsch Gesundheitsw*, 20: 1935-1940.

Babincova M, Leszczynska D, Sourivong P, Babinec P. 2000. Selective treatment of neoplastic cells using ferritin-mediated electromagnetic hyperthermia. *Med Hypotheses*, 54(2): 177-179.

Bahadur D, Giri J. 2003. Biomaterials and magnetism. *Sadhana*, 28 (3,4): 639-656.

Bean CP, Jacobs IS. 1956. Magnetic granulometry and superparamagnetism. *J Appl Phys*, 27: 1448-1452.

Berry CC, Curtis ASG. 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*, 36: 198-206.

Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis ASG. 2004. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25: 5405–5413.

Boddie AWJ, Wright K, Frazer JW, Stephens LC, Montgomery L, Mc Bride CM, Wallace S, Martin RG. 1986. Mechanisms of synergism between arteriolar embolization and hyperthermia in a rabbit V-2 model of solitary hepatic metastasis. *Cancer Res*, 46: 4576-4581.

Bremer C, Allkemper T, Baermig J, Reimer P. 1999. RES-specific imaging of the liver and splen with iron oxide particles designed for blood pool MR-angiography. *J Magn Reson Imaging*, 10: 461-467.

Brigger J, Dubernet C, Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54: 631-651.

Chan DC, Kirpotin DB, Bunn PA. 1993. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *J Magn Magn Mater*, 122: 374-378.

Claaßen G. 2002. Magnetresonanztomographische und histologische Untersuchungen an Ratten mit Zitrat-stabilisierten, kleinen Eisenoxidpartikeln als Kontrastmittel für die intravenöse MR-Lymphographie [Inaugural-Dissertation]. Berlin: Freie Universität.

Elizondo G, Weissleder R. 1990. Hepatic cirrhosis and hepatitis: MR imaging enhanced with superparamagnetic iron oxide. *Radiology*, 174: 797-801.

Feynman RP. 1959. There is plenty of room at the bottom. Rede vom 29.12.1959 auf dem "Annual meeting of the American Physical Society" am California Institute of Technology, Pasadena, CA.

Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.

Frühauf K. 2001. Evaluierung von temperaturrelevanten Parametern zur lokalen Erwärmung von Geweben mittels magnetischer Thermoablation [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Frühauf S. 2001. Magnetische Thermoablation zur minimal invasiven Beseitigung von Brusttumoren: In-vitro-Untersuchungen an einer humanen Adenokarzinom-zelllinie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. 1957. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg*, 146: 596–606.

Graydon O. 1998. Nature`s nanostructures colour wings and stones. *OLE*, 31-36.

Grimm J, Karger N, Lusse S, Winoto-Morbach S, Krisch B, Muller-Hulsbeck S, Heller M. 2002. Characteristics of Ultrasmall, Paramagnetic Magnetite Particles as Superparamagnetic Contrast Agents in MRI. *Investigative Radiology*, 35(9): 553-556.

Günter D. 1996. Tumor-Diagnostik, Therapie und Drug-Targeting mit magnetischen Flüssigkeiten. *Pharmazie Unserer Zeit*, 25: 130-134.

Hanson M. 1991. The frequency dependence of the complex susceptibility of magnetic liquids. *J Magn Magn Mater*, 96: 105-113.

Harris LA. 2002. Polymer stabilized Magnetite nanoparticles and Poly-(propylenoxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks [Dissertation]. Blacksburg, USA: Virginia Polytechnic Institute and State University.

Hemmingsson A, Carlsten J, Ericsson A, Klaveness J, Sperber GO, Thuomas KA. 1987. Relaxation enhancement of the dog liver and spleen by biodegradable superparamagnetic particles in proton magnetic resonance imaging. *Acta Radiol*, 28: 703-705.

Hergt R, Andrä W, d'Ambly CG, Hilger I, Kaiser WA, Richter U, Schmied HG. 1998. Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles. *IEEE Trans Magn*, 34: 3745-3754.

Hergt R, Hiergeist R, Zeisberger M, Glöckl G, Weitschies W, Ramirez LP, Hilger I, Kaiser WA. 2004a. Enhancement of AC-losses of magnetic nanoparticles for heating applications. *J Magn Magn Mater*, 280: 358-368.

Hergt R, Hiergeist R, Hilger I, Kaiser WA, Lapatnikov Y, Margel S, Richter U. 2004b. Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia. *J Magn Magn Mater*, 270: 345-57.

Hiergeist R, Andrä W, Buke N, Hergt R, Hilger I, Richter U, Kaiser WA. 1999. Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia. *J Magn Magn Mater*, 201: 420-422.

Hilger I, Andrä W, Hergt R, Hiergeist R, Schubert H, Kaiser WA. 2001. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. *Radiology*, 218: 570-575.

Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. 2002. Thermal Ablation of Tumors Using Magnetic Nanoparticles: An In Vivo Feasibility Study. *Investigative Radiology*. 37(10):580-586.

Hilger I, Kießling A, Romanus E, Hiergeist R, Hergt R, Andrä W, Roskos M, Linß W, Weber P, Weitschies W, Kaiser WA. 2004. Magnetic nanoparticles for selective heating of magnetically labelled cells in culture: preliminary investigation. *Nanotechnology*, 15: 1027-1032.

Hodenus M. 2002. Polymer- und liposomstabilisierte Ferrofluide und ihre Funktionalisierung [Dissertation]. Aachen: Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule.

Hülser T. 2003. Strukturelle und magnetische Eigenschaften von Eisenkarbid- und Eisenoxid-Nanopartikeln [Diplomarbeit]. Duisburg: Universität Duisburg-Essen.

Jordan A, Wust P, Scholz R, Tesche B, Fahling H, Mitrovics T, Vogl T, Cervos-Navarro J, Felix R. 1996. Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int J Hyperthermia*, 12(6):705-722.

Jordan A, Scholz R, Wust P, Föhling H, Krause J, Wlodarczyk W, Sander B, Vogl T, Felix R. 1997. Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int J Hyperthermia*, 13: 587-605.

Jordan A. 2001. Nanotechnologie – ein neues Konzept für Diagnostik und Therapie maligner Tumoren. *Onkologe*, 7: 1073–1081.

Kautz A. 2004. persönliche Mitteilung. INNOVENT e.V. Prüssingstr. 27b, 07745 Jena.

Kehagias DT, Goulimos AD, Smyniotis V, Vlahos LJ. 2001. Diagnostic efficacy and safety of MRI of the liver with superparamagnetic iron oxide particles (SH U 555A). J Magn Reson Imaging, 15: 595-60.

Kießling A. 2003. Bindungsfähigkeit und Wärmeausbeute von magnetischen Nanopartikel an Zellen in Kultur [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Kittel CH. 1989. Einführung in die Festkörperphysik. 12. Auflage. München-Wien.

Kobozev NI, Evdokimov VB, Zubovich IA, Malt'sev AN. 1952. Magnetochemistry of active centers.I. Magnetic and catalytic properties of dilute layers. Zhur Fiz Khim, 26: 1349- 1373.

Kreft BP, Tanimoto A, Leffler S, Finn JP, Oksendal AN, Stark DD. 1994. Contrast-enhanced MR-imaging of diffuse and focal splenic disease with use of magnetic starch microspheres. J Magn Reson Imaging, 4: 373-379.

Kularatne BY, Lorigan P, Browne S, Survana K, Smith MO, Lawry J. 2002. Monitoring tumor cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. Cytometry, 50: 160-167.

Legendijk JJ, Schellekens M, Schipper J, Linden PM. 1984. A three-dimensional description of heating patterns in vascularised tissues during hyperthermic treatment. Phys Med Biol, 29: 495-507.

Lao L, Ramanujan V. 2004. Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications. J Mater Sci Mater Med, 15: 1061-1064.

Lawaczek R, Bauer H, Frenzel T, Hasegawa M, Ito Y, Kito K, Miwa N, Tsutsui H, Vogler H, Weinmann HJ. 1997. Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical Profile of SHU 555A. Acta Radiol, 38: 584-97.

Leslie-Pelecky DL. 1996. Magnetic Properties of Nanostructured Materials. Chem Mater, 8: 1770-1783.

Lindl T, Bauer J. 1994. Zell- und Gewebekultur, 3. Auflage ed., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Matsuoka F, Shinkai M, Honda H, Kubo T, Sugita T Kobayashi T. 2004. Hyperthermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma. Biomagnetic Research and Technology, 2: 1-6.

Merbach AE, Tóth E, Hrsg. 2001 The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance Imaging, Wiley.

Mitsumori M, Hiraoka M, Shibata T, Okuno Y, Masunaga S, Koishi M, Okajima K, Nagata Y, Nishimura Y, Abe M. 1994. Development of intra-arterial hyperthermia using a dextran-magnetite complex. Int J Hyperthermia, 10: 785-793.

Moore A, Weissleder R, Bogdanov A Jr. 1997. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. J Magn Reson Imaging, 7(6): 1140-1145.

Moore A, Marecos E, Bogdanov A Jr, Weissleder. 2000. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. Radiology, 214: 568-574.

Morisada S, Miyata N, Iwahori K. 2002. Immunomagnetic separation of scum-forming bacteria using polyclonal antibody that recognizes mycolic acids. J Microbiol Methods, 51: 141-148.

Mühler A, Zhang X, Wang H, Lawaczeck R, Weinmann HJ. 1995. Investigation of mechanisms influencing the accumulation of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles in lymph nodes. Invest Radiol, 30: 98-103.

Murata T, Akagi K, Nasu R, Kimura H, Nagata K, Tanaka Y. 1998. Studies on hyperthermia combined with arterial therapeutic blockade for treatment of tumors: (Part III) effectiveness of hyperthermia combined with arterial chemo-embolization using degradable starch microspheres on advanced liver cancer. *Oncol Rep*, 5: 709-712.

Néel L. 1949. Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites. *Ann Geophys*, 5: 99-136.

O'Connell K, Edidin M. 1990. A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells. *J Immunol*, 144: 521-525.

Odenbach S. 2001. Ferrofluide - ihre Grundlage und Anwendungen. *Physik Unserer Zeit*, 32: 122-127.

Odenbach S. 2004. Recent progress in magnetic fluid research. *J Phys Condens Matter*, 16: 1135-1150.

Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine *J Phys D Appl Phys*, 36: 167-181.

Saeed M, Wendland MF, Engelbrecht M, Sakuma H, Higgins CB. 1998. Value of blood pool contrast agents in magnetic resonance angiography of the pelvis and lower extremities. *Eur Radiol*, 8: 1047-1053.

Saini S, Stark DD, Hahn PF, Wittenberg J, Brady TJ, Ferruci JT. 1987. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology*, 162: 211-216.

Schatt W. 1978. Werkstoffwissenschaften. Leipzig. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie.

Schellenberger EA, Bogdanov Jr A, Hogemann D, Tait J, Weissleder R, Josephson L. 2002. Annexin-V-CLIO: an nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. *Molecular Imaging*, 1: 102-107.

Schmitz SA, Taupitz M, Wagner S, Wolf KJ, Beyersdorff D, Hamm B. 2001. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J Magn Reson Imaging*, 14: 355-361.

Shinkai M, Suzuki M, Iijima S, Kobayashi T. 1995. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia. *Biotechnol Appl Biochem*, 21: 125–37.

Shinkai M, Ueda K, Ohtsu S, Honda H, Kohri K, Kobayashi T. 1999. Effect of functional magnetite particles on radiofrequency capacitive heating. *Jpn J Cancer Res*, 90: 699-704.

Shinkai M, Le B, Honda H, Yoshikawa K, Shimizu K, Saga S, Wakabayashi T, Yoshida J and Kobayashi T. 2001. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human mn antigenspecific magnetoliposomes. *Jpn J Cancer Res*, 92: 1138-1146.

Smit J, Wijn HPJ. 1962. Ferrite. Die physikalischen Eigenschaften von ferrimagnetischen Oxyden unter Berücksichtigung ihrer technischen Anwendung. *Philips Technische Bibliothek*, 305-320.

Ström V, Hulténby K, Grüttner C, Teller J, Xu B, Holgersson J. 2004. A novel and rapid method for quantification of magnetic nanoparticle-cell interactions using a desktop susceptometer. *Nanotechnology*, 15: 457–466.

Suzuki M, Shinkai M, Kamihira M, Kobayashi T. 1995. Preparation and characteristics of magnetite-labelled antibody with the use of poly(ethyleneglycol) derivatives. *Biotechnol Appl Biochem*, 21: 335-345.

Suzuki M, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. 2003. Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes. *Melanoma Res*, 13(2): 129-135.

Tartaj P, del Puerto Morales M, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*, 36: 182-197.

Taupitz M, Schnorr J, Abramjuk C, Wagner S, Pilgrimm H, Hunigen H, Hamm B. 2000. New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: preclinical results in rats and rabbits. *J Magn Reson Imaging* 12: 905-911.

Taupitz M, Schmitz S, Hamm B. 2003. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. *Fortschr Röntgenstr*, 175: 752-765.

Tibbe A, de Grooth B, Greve J, Liberti P, Dolan G, Terstappen L. 1999. Optical tracking and detection of immunomagnetically selected and aligned cells. *Nat Biotechnol*, 17: 1210-1213.

Tipler P. 1995. Physik. Heidelberg-Berlin-Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

VDI (Verein deutscher Ingenieure) Hrsg. Bachmann. 1998. Technologieanalyse, Innovationen aus dem Nanokosmos.

Vogl TJ, Schwarz W, Hammerstingl R, Kummel S, Balzer JO, Mack MG, Diebold T, Balzer T, Shamsi K, Bechstein WO, Schrem H, Neuhaus P, Felix R. 1997. Dynamic and static MRI using superparamagnetic MRI contrast medium RESOVIST for visualizing primary and secondary liver tumors. *Fortschr Geb Röntgenstr*, 167: 254-273.

Walter-Yohrling J, Morgenbesser S, Rouleau C, Bagley R, Callahan M, Weber W, Teicher BA. 2004. Murine Endothelial Cell Lines as Models of Tumor Endothelial Cells. Clin Cancer Res, 10: 2179-2189.

Wang Y, Hussain S, Krestin G. 2001. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. Eur Radiol, 11: 2319-2331.

Weissleder R, Hahn PF, Stark DD, Rummeny E, Saini S, Wittenberg J, Ferrucci JT. 1987. MR Imaging of splenic metastases: ferrite enhanced detection in rats. Radiology ,149: 723-726.

Weissleder R, Stark DD, Rummeny E, Compton CC, Ferrucci JT. 1988. Splenic Lymphoma: Ferrite-enhanced MR Imaging in rats. Radiology, 166: 423-430.

Weissleder R, Elizondo G, Josephson L, Compton CC, Fretz CJ, Stark DD, Ferrucci JT. 1989a. Experimental lymph node metastases: enhanced detection with MR-lymphography. Radiology, 171: 835-839.

Weissleder R, Elizondo G, Stark DD, Hahn PF, Marfil J, Gonzales JF, Saini S, Todd LE. 1989b. The diagnosis of splenic lymphoma by MR imaging: value of superparamagnetic iron oxide. AJR, 152: 175-180.

Weissleder R, Lee AS, Fischman AJ, Reimer P, Shen T, Wilkinson R, Callahan RJ, Brady TJ. 1991. Polyclonal human Immunoglobulin G labeled with polymeric Iron Oxide: Antibody MRI. Radiology, 181: 245-249.

Weitschies W. 2004. persönliche Mitteilung. Instiut für Pharmazie, Universität Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn-Straße 17, 17487 Greifswald.

Widder DJ, Greif WL, Widder KJ, Edelman RR, Brady TJ. 1987. Magnetite albumin microspheres: a new contrast material. Am J Roentgenol, 148: 399-404.

Woltz S. 2003. Herstellung nanoskaliger Magnetit-Teilchen durch Glaskristallisation [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Wormuth K. 2001. Superparamagnetic latex via inverse emulsion polymerization. J Colloid Interface Sci, 241(29): 366-377.

Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. Lancet Oncol, 3: 487–97.

Zhang Y, Kohler N, Zhang M. 2002. Intracellular uptake of poly(ethylenglycol) and folic acid modified magnetite nanoparticles. Mat Res Soc Symp Proceedings, 676: Y981-Y985.

Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, Hofstetter A, Oberneder R. 2003. Isolation of circulating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry in vitro. J Urol, 169: 701-705.

7 Anhang

7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken. Insbesondere möchte ich danken:

Frau PD Dr. rer. nat. Ingrid Hilger für die Vergabe des Themas, die sehr gute und engagierte Betreuung, die zahlreichen Ratschläge und die vielen Diskussionen

Herrn Prof. Dr. med. Dipl. chem. Werner A. Kaiser für die mir gebotene Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu können

Frau Dr. rer. nat. Christine Fritsche für ihr jederzeit offenes Ohr, ihre wertvollen Hinweise und die stete Hilfestellung

Frau Yvonne Heyne und **Frau Brigitte Maron** für ihre freundliche Unterstützung in allen Situationen und die gute Zusammenarbeit

Frau Streck für die rasche Durchführung der vielen Eisenanalysen

Elke Dietmar, Axel Dübner und **Juliane Keil** für die freundschaftliche Zusammenarbeit an so manchem Wochenende im Labor

Meiner Familie und **meinen Freunden** (besonders **Wiebke** und **Uli**) für ihre Geduld, ihre moralische Unterstützung und ihr Verständnis

Johannes Leuchtweis dafür, dass er mir mit Aufmunterung, Teilnahme und viel Liebe immer zur Seite steht

7.2 Lebenslauf

Name:	Susanne Katharina Polloczek
Geburtsdatum:	29.5.1979
Geburtsort:	Ansbach
9/1985 – 7/1989	Besuch der Grundschule (Weinbergschule Ansbach)
9/1989 – 7/1995	Besuch des Gymnasium Carolinum Ansbach
8/1995 – 3/1996	High School Senior in Gaston, Oregon, USA
3/1996 – 6/1998	Oberstufe des Gymnasium Carolinum Ansbach
10/1998- heute	Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
9/2000	ärztliche Vorprüfung
9/2001	1. Staatsexamen
Seit 12/2002	Beginn der Promotion
9/2004	2. Staatsexamen
10/2004	Beginn des Praktischen Jahres

Jena, den 24.04.2005

Susanne Polloczek

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Frau PD Dr. I. Hilger, Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, FSU Jena
- Frau Dr. C. Fritsche, vormals Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, FSU Jena

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 24.04.2005

Susanne Polloczek

